



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 5/10, 5/08, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/19567 (43) Date de publication internationale: 27 juin 1996 (27.06.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01691 (22) Date de dépôt International: 18 décembre 1995 (18.12.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/15497                      22 décembre 1994 (22.12.94)    FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KLEIN, Antoinette [FR/FR]; 44, rue Florian, F-92160 Antony (FR). HATZFELD, Jacques [FR/FR]; 44, rue Florian, F-92160 Antony (FR). (74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset- Fournier & Demachy s.a.r.l., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).	(81) Etats désignés: US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.          Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: METHOD FOR GENE TRANSFER INTO CELLS ACTIVATED OUT OF A QUIESCENT STATE

(54) Titre: PROCEDE DE TRANSFERT DE GENE DANS DES CELLULES ACTIVEES A PARTIR D'UN ETAT DE REPOS

(57) Abstract

Means are used for blocking at least one cell cycle inhibitor for at most 72 hours, preferably at most 36 hours, particularly less than around 20 hours, preferably around 1-15 hours, and more preferably 1-10 hours, in a stem cell culture, in order to release the stem cells from their quiescent state.

(57) Abrégé

L'invention concerne l'utilisation de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire pendant une durée n'excédant pas 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et notamment inférieure à environ 20 h, et de préférence d'environ 1 à 15 h, et de préférence d'environ 1 à 10 h, dans une culture de cellules souches, afin de libérer les cellules souches de leur état de repos.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les États parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BV	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## PROCEDE DE TRANSFERT DE GENE DANS DES CELLULES ACTIVEES A PARTIR D'UN ETAT DE REPOS.

---

L'invention a pour objet un procédé de transfert de gène dans des cellules activées à partir d'un état de repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques, et les cellules ainsi obtenues.

Le progrès dans l'identification et le clonage de gènes responsables de maladies génétiques humaines, a conduit à un effort important pour l'amélioration de la technologie de transfert de gène (Anderson, W.F. (1992) *Science*, 256: 808-813; Miller, A.D. (1992) *Nature*, 357: 455-460; Morgan, R.A., & Anderson, W.F. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 191-217; Karlsson, S. (1991) *Blood*, 78: 2481-2492). Par exemple, différents vecteurs viraux ont été utilisés pour les cellules souches hématopoïétiques, chacune présentant leur propre avantage (Anderson, W.F. (1992), susmentionné). L'insertion de vecteur rétroviral dans le génome hôte assure sa réplication dans la cellule hôte. Cette insertion nécessite un état prolifératif actif (Anderson, W.F. (1992), susmentionné; Varmus, H.E., Padgett, T., Heasley, S., Simon, G., & Bishop, J.M. (1977), *Cell*, 11: 307-319; Nolte, J.A., & Kohn, D.B. (1990) *Hum. Gene Ther.*, 1: 257-268; Miller, D.G., Adam, M.A., & Miller, A.D. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4239-4242) qui n'existe pas dans le compartiment de la cellule souche hématopoïétique qui est à l'état de repos (Lajtha, L.G., & Schofield, R. (1974) *Différenciation*, 2: 313-320), ou dans d'autres types de cellules souches et des cellules somatiques telles que les cellules hépatiques. En utilisant des oligonucléotides antisens contre le(s) gène(s) inhibiteur(s), en particulier TGF- $\beta$ -I, on a montré que les progéniteurs de la moelle osseuse humaine précoces peuvent être relâchés de leur état de repos par blocage d'une TGF- $\beta$  autocrine (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E.L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S.C., & Hatzfeld, A. (1991), *J. Exp. Med.*, 174: 925-929).

Par ailleurs, s'agissant de greffes de tissu hématopoïétique, dans le passé, la capacité à greffer des échantillons de moelle osseuse a été analysée par l'estimation du contenu en cellules CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte/macrophage: progéniteur granulo-monocytaire). Cependant, ces cellules qui vraisemblablement jouent un rôle important dans la génération cellulaire pendant une courte période suivant la transplantation d'un greffon, peuvent ne pas refléter le contenu en cellules plus primitives, et notamment en cellules souches hématopoïétiques qui sont importantes dans l'hématopoïèse à long terme. Les cellules souches impliquées dans des greffes à long terme

représentent une petite sous population de cellules pouvant avoir éventuellement le phénotype CD34+CD38- (compartiment de la cellule souche hématopoïétique: cellules riches en antigène membranaire CD34 et pauvres en antigène membranaire de maturation CD38).

Récemment, du sang de cordon ombilical humain s'est révélé être suffisant pour reconstituer l'hématopoïèse, après la transplantation chez des enfants (Gluckman, E., Broxmeyer, H.E., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., & Boyse, E.A. (1989) *N. Eng. J. Med.*, 3: 1174-1178; Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., & Boyse, E.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3828-3832; Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., & Cooper, S. (1992) *Bone Marrow Transplant.*, 9: 7-10). *In vitro*, les données de différents laboratoires (Broxmeyer, H.E., Hangoc, G., Cooper, S., Ribeiro, R.C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., & Broun, E.R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4109-4113; Lu, L., Xiao, M., Shen, R.-N., Grisby, S., & Broxmeyer, H.E. (1993) *Blood*, 81: 41-48; Hows, J.M., Bradley, B.A., Marsh, J.C.W., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N.G., & Dexter, T.M. (1992) *Lancet*, 340: 73-76; Cardoso, A.A., Li, M.L., Batard, P., Hatzfeld, A., Brown, E.L., Levesque, J.-P., Sookdeo, H., Panterne, B., Sansilvestri, P., Clark, S.C., & Hatzfeld, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8707-8711) suggèrent que le sang de cordon ombilical a une capacité supérieure pour générer les progéniteurs en culture, à celle de la moelle osseuse, et par conséquent, que le sang de cordon ombilical pourrait être suffisant pour effectuer des greffes de tissus hématopoïétiques sur des receveurs adultes.

Cependant, à ce jour, un transfert de gène rapide dans l'ensemble (totalité) du compartiment de la cellule souche hématopoïétique ou de toute autre cellule souche ou somatique au repos, (cet état de repos étant également désigné par "quiescence" ou comme correspondant à la phase Go), n'était pas obtenu de façon satisfaisante.

Le transfert de gène dans des cellules activées à partir d'un état de repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, est l'un des aspects de l'invention.

L'invention a également pour objet des cellules à l'état de repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques à l'état de repos, contenant un gène hétérologue.

L'invention a également pour objet du tissu hématopoïétique contenant un gène hétérologue susceptible de constituer des greffons à long terme

L'invention concerne des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, contenant dans leur génome tout ou partie d'un gène hétérologue.

L'invention concerne l'utilisation de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire pendant une durée n'excédant pas 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et notamment inférieure à environ 20 h, et de préférence d'environ 1 à 15 h, et de préférence d'environ 1 à 10 h, dans une culture de cellules souches, afin de libérer les cellules souches de leur état de repos.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet l'utilisation de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire dans un test de comparaison, d'une part, entre une culture de cellules souches dans un milieu contenant les sus-dits moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire et, d'autre part, entre une même culture de cellules souches que celle mentionnée ci-dessus dans un milieu ne contenant pas de sus-dit moyen de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, afin de déterminer le degré de maturité des sus-dites cellules souches.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'utilisation de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire dans une culture de cellules souches, afin de libérer les cellules souches de leur état de repos, suivie d'une étape de transfert de gènes dans les sus-dites cellules souches.

Dans le cadre de l'invention, les cellules souches sont avantageusement des cellules hématopoïétiques et les moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire sont avantageusement constitués par de l'anti TGF- $\beta$ .

L'invention concerne des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, contenant tout ou partie d'un gène hétérologue dans leur génome, susceptibles d'être obtenues selon le procédé comprenant les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques, pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques, de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et est

notamment inférieure à environ 20 h, et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

\* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, obtenues à l'étape précédente.

L'invention concerne plus particulièrement des cellules souches hématopoïétiques contenant dans leur génome tout ou partie d'un gène hétérologue et ayant un potentiel de multiplication *in vitro* égal ou supérieur à  $10^6$  et un potentiel de différenciation susceptible de couvrir tous les lignages hématopoïétiques.

Les cellules souches hématopoïétiques sont définies comme des cellules au repos pouvant donner naissance à tous les lignages hématopoïétiques et aux cellules en dérivant. Quelle que soit l'origine des cellules souches (foie foetal, moelle foetale, sang de cordon ombilical, moelle adulte, sang périphérique) leur potentiel de prolifération est toujours très élevé: une cellule donnant naissance à plus de 1 à  $20 \times 10^6$  cellules *in vitro*. Ce nombre peut être plus élevé si l'on utilise de nouvelles cytokines et des bioréacteurs.

Les cellules souches hématopoïétiques peuvent provenir d'échantillon de moelle osseuse originaire d'une ponction de la crête iliaque sur des donneurs de moelle osseuse.

Les cellules souches hématopoïétiques peuvent également être récupérées à partir de sang de cordon ombilical prélevé immédiatement après la naissance, de foie ou de moelle foetale de sang périphérique ou de tout autre organe du système hématopoïétique.

Un potentiel de multiplication égal ou supérieur à  $10^6$  signifie qu'une cellule souche hématopoïétique peut donner, dans des conditions appropriées,  $10^6$  cellules du sang.

Le potentiel de multiplication des cellules souches hématopoïétiques de l'invention peut atteindre 1 à  $20 \times 10^6$  cellules en milieu Stem GEM\* et en

culture traditionnelle. Cette valeur peut être élevée si l'on utilise de nouvelles cytokines et des bioreacteurs.

Par lignages hématopoïétiques, on désigne l'ensemble des cellules donnant naissance à l'un des différents types cellulaires du sang.

Par cellules au repos susceptibles de rentrer dans le cadre de l'invention, on désigne des cellules qui ne se multiplient pas en situation physiologique ordinaire et sont susceptibles d'être activées en culture. Comme exemple, on peut citer: les cellules du foie, du tissu osseux, des cellules endothéliales, du tissu du système nerveux, etc..., ou des cellules souches hématopoïétiques qui restent pour la majorité d'entre elles au repos chez l'individu normal.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, comportant, à l'intérieur d'elles mêmes ou sur leur surface, des moyens de blocage de tout inhibiteur de leur cycle cellulaire.

Comme moyens de blocage d'inhibiteurs du cycle cellulaire à l'intérieur de la cellule, on peut citer des oligonucléotides antisens, des ribozymes, des inhibiteurs chimiques naturels ou de synthèse, des anticorps bloquants, des cytokines telles que le TNF, des interférons ou des facteurs tels que le MIP-1 $\alpha$ , le facteur 4 plaquettaire ou le FGF. Ceux-ci peuvent pénétrer naturellement avec des milieux de cultures appropriées ou par électroporation, par microinjection ou par tout autre procédé utilisant un transport à travers la membrane tels que les liposomes.

Comme moyens de blocage d'inhibiteurs du cycle cellulaire sur la surface de la cellule, on peut citer des anticorps de récepteurs ou d'antigènes membranaires, des ligands de récepteur, naturels ou de synthèse, des combinaisons de cytokines comprenant diverses interleukines et Colony Stimulating Factors, CSFs (facteurs stimulant les colonies) ou facteurs de croissance hématopoïétiques.

Les anticorps et les ligands se fixent spécifiquement sur un antigène ou un récepteur qui leur correspond.

Dans les cellules de l'invention, notamment dans les cellules souches hématopoïétiques, les moyens de blocage peuvent être constitués par ceux choisis parmi: les anti-inhibiteurs du cycle cellulaire, par exemple des agents bloquant les gènes suppresseurs de tumeurs, des antagonistes du TGF- $\beta$  tels que: des oligonucléotides antisens du TGF- $\beta$ , des anticorps neutralisant le TGF- $\beta$ , des récepteurs solubles du TGF- $\beta$  ou des inhibiteurs naturels ou de synthèse du TGF- $\beta$ .

L'abréviation TGF- $\beta$  correspond à "transforming growth factor" (facteur de croissance transformant) et correspond à une famille de protéines.

Comme exemple d'antigènes suppresseurs de tumeurs, on peut citer pRb, p107 (Zhu et al., *Genes and development*, 7: 1111-1125, 1993), p130 (Hannon et al., *Genes Dev.*, 7: 2378-2391, 1993), p300, p53, p15 (Hannon G.J. & Beach D. (1994): "p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest". *Nature*, 371: 257), p16 (Iverson A.J. (1994): "p16 and familial melanoma". *Nature Genet.*, 371: 180, Sansilvestri P. Thèse de Doctorat d'Etat Paris XI, 1994), p21 (Xiong Y., et al., & Beach D. (1993): "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases". *Nature*, 366: 701), p27 (Polyak et al. (1994a): "Cloning of p27<sup>kpl</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals". *Cell*, 78: 59-66; Polyak et al. (1994a): "p27<sup>kpl</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor  $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest". *Genes Development*, 8: 9-22).

Par antagonistes du TGF- $\beta$ , on désigne un agent qui neutralise *in vitro* ou *in vivo* l'activité biologique du TGF- $\beta$ , types 1, 2 ou 3.

Par anticorps neutralisants, on désigne un anticorps ou une combinaison d'anticorps, de préférence un anticorps monoclonal ou une combinaison d'anticorps monoclonaux, qui neutralise *in vitro* ou *in vivo* l'activité biologique du TGF- $\beta$  de types 1, 2 ou 3.

Par inhibiteur naturel ou de synthèse du TGF- $\beta$ , on désigne une substance qui inhibe *in vitro* ou *in vivo* l'activité biologique du TGF- $\beta$ .

Comme nucléotide antisens du TGF- $\beta$ , on peut avantageusement utiliser:

5'-CCCGGAGGGCGGCATGGGGGA-3'

Comme moyens de blocage, on peut également envisager une cytokine ou une combinaison de cytokines susceptibles de libérer les cellules souches de l'état de repos pendant une durée inférieure à environ 10 h.

Comme cytokines, on peut citer: toutes les interleukines, tous les CSF, (facteurs stimulant les colonies) tous les immunomodulateurs (par exemple les interleukines suivantes: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, les TNF (Tumor Necrosis Factors: Facteurs Nécrosant de Tumeur), les interférons, le LIF (facteur inhibiteur de leucémie), le MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein: protéine inflammatoire produite ou agissant sur le macrophage, Dunlop D.J. et al.: *Blood*, 1992, 79: 2221-2225), le Steel Factor ou Facteur Steel, le ligand du récepteur *flt-3* ou FL.

Comme combinaison de cytokines, on peut citer l'IL3, l'IL6, le GMCSF (facteur de croissance des progéniteurs granulo-monocytaires), le SF et le FL.



Les moyens de blocage de tout inhibiteur du cycle cellulaire doivent être utilisés en quantité appropriée pour neutraliser l'activité de tout inhibiteur du cycle cellulaire. Ils sont généralement utilisés à des concentrations allant de 0,1 à 1000 unités/ml, de préférence de 1 à 10 unités/ml.

Lorsqu'on utilise un oligonucléotide antisens du TGF- $\beta$ , celui-ci peut être utilisé de 0,03  $\mu$ M à 100  $\mu$ M, notamment de 5  $\mu$ M à 8  $\mu$ M, ou de 0,01  $\mu$ M à 0,5  $\mu$ M en présence de certains agents par exemple lipidiques permettant une meilleure pénétration des oligonucléotides dans la cellule que les pénétrations précédemment décrites.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne des cellules à l'état de repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques contenant, intégré dans leur génome, tout ou partie d'un gène hétérologue.

En fait, après le transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans leur patrimoine génétique, les cellules peuvent être replacées à l'état de repos.

Le procédé selon lequel, après transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue, les cellules sont replacées à l'état de repos, est détaillé dans la suite de la présente description.

L'invention concerne également une composition de cellules hématopoïétiques ou un amas de cellules hématopoïétiques ou un tissu de cellules hématopoïétiques, susceptibles de maintenir une hématopoïèse continue pendant une durée supérieure ou égale à environ 6 mois, et constitués par des cellules souches hématopoïétiques et le cas échéant des progéniteurs en cours de différenciation, les susdites cellules souches et les susdits progéniteurs contenant tout ou partie d'un gène hétérologue.

L'expression "maintenir une hématopoïèse continue" correspond à une production physiologique de cellules matures du sang.

L'invention concerne également un procédé de transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans le génome de cellules activées à partir d'un état de repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu de préstimulation contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules au repos, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence environ 72 h, n'excédant pas de préférence 36

h, et est notamment inférieure à environ 20 h et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et .

\* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques préstimulées obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, obtenues à l'étape précédente.

Les cellules souches hématopoïétiques au repos utilisées dans le cadre du transfert de gène peuvent être obtenues à partir d'organes hématopoïétiques foetaux, de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse, de sang périphérique ou de tout autre organe hématopoïétique, selon le procédé décrit dans les exemples (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A.A., Li M.-L., et Hatzfeld A.: "Purification and *in vitro* assay of early human hematopoietic progenitors", 205-221. Dans *Culture of Hematopoietic Cells*. Freshney R.I., Pragnell I.B., Freshney M.G., 1994).

En ce qui concerne la durée de la préstimulation, elle n'excède pas environ 72 h, de préférence 36 h, et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h.

L'induction de la préstimulation peut se faire pendant un temps extrêmement court, de l'ordre de quelques secondes, mais le déclenchement de l'ensemble des mécanismes cellulaires permettant à la cellule souche de sortir de la phase Go prennent au moins 1 h.

Dans le cas de l'utilisation, comme moyen de blocage, d'anti-TGF- $\beta$ , la préstimulation n'excède pas environ 72 h, car au-delà de 72 h, et notamment au-delà de 19 h, on n'a pas d'effet supplémentaire à la préstimulation obtenue avec des combinaisons de cytokines ou l' anti-TGF- $\beta$  et des combinaisons de cytokines.

L'expression "activation d'un cycle cellulaire" correspond à la mise en place des fonctions permettant la traversée du cycle cellulaire.

L'expression "la traversée d'au moins un cycle cellulaire" correspond à une division du génome (phase S), et à une mitose donnant deux cellules identiques.

A l'issue du transfert de gène, les cellules peuvent, soit se multiplier et se différencier, soit peuvent être replacées à l'état de repos, comme il est explicité dans la suite de la description.

Lorsque l'on replace les cellules souches transfectées à l'état de repos, le compartiment de la cellule souche a "vieilli" d'une division ce qui est peu par rapport à son énorme potentiel hématopoïétique.

Dans le procédé de l'invention, selon un mode de réalisation avantageux le milieu de préstimulation comprend: IMDM (Iscove Dubelcco Modified Medium), (StemGEM\* correspondant à une gamme de milieux commercialisés par le C.N.R.S.), des cytokines, des antagonistes du TGF- $\beta$  tels que des oligonucléotides antisens du TGF- $\beta$ , des anticorps neutralisants le TGF- $\beta$ , des récepteurs solubles du TGF- $\beta$  ou des inhibiteurs naturels ou de synthèse du TGF- $\beta$ , des combinaisons de cytokines susceptibles de bloquer dans un espace de temps court (inférieur à 72 h, de préférence inférieur à 10 h), les inhibiteurs du cycle cellulaire des cellules souches quiescentes, contrôlés ou non par le TGF- $\beta$ .

Selon un mode de réalisation du procédé de l'invention, les cytokines sont choisies parmi une combinaison d'au moins quatre cytokines choisies parmi les cytokines suivantes: IL1 (interleukine 1), IL2 (interleukine 2), IL3 (interleukine 3), IL4 (interleukine 4), IL5 (interleukine 5), IL6 (interleukine 6), IL7 (interleukine 7), IL11 (interleukine 11), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: facteur de croissance des progéniteurs granulomonocytaires), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor: facteur de croissance des progéniteurs granulocytaires), facteur Steel (SF), ligand du récepteur FLT3 (FL), érythropoïétine, TNF, LIF (leukemia inhibitor factor: facteur inhibiteur de la leucémie), thrombopoïétine, insulines et FGF.

Le transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue peut se faire avec une coculture de cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées selon la première étape du procédé de l'invention, et de cellules produisant un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus, contenant tout ou partie du gène à transférer. (Ferry N., Duplessis O., Houssin D., Danos O., et Heard J.-M. "Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*". Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 8377-8381, 1991).

Le transfert peut également être effectué en remettant en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées et du

surnageant de cellules contenant un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus comprenant tout ou partie du gène à transférer (Lu, R.L., Xiao, M., Clapp, D.-W., Li, Z.-H., & Broxmeyer, H.E. (1993) *J. Exp. Med.*, 178: 2089-2096).

L'invention concerne également un procédé de transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans le génome de cellules activées à partir d'un état de repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu de préstimulation contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence environ 72 h, et n'excédant pas de préférence environ 36 h, et est notamment inférieure à environ 20 h et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

- \* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules souches, par coculture de cellules, notamment de cellules souches hématopoïétiques préstimulées comme indiqué ci-dessus et de cellules produisant un vecteur viral ou un rétrovirus contenant tout ou partie du gène à transférer, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente.

La coculture peut être effectuée comme décrit dans Human Cord Blood Cells as Targets for Gene Transfer: Potential Use in Genetic Therapies of Severe Combined Immunodeficiency Disease. Moritz T., Keller D.C. et Williams D.A., *J. Exp. Med.*, 178: 529-536 (1993).

L'invention concerne également un procédé de transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans le génome de cellules activées à partir d'un état de

repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu de préstimulation contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques, pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence environ 72 h, et n'excédant pas de préférence environ 36 h, et est notamment inférieure à environ 20 h et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

- \* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire des dites cellules souches,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, par mise en présence des cellules, notamment des cellules souches préstimulées comme indiqué ci-dessus et du surnageant de cellules contenant un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus contenant tout ou partie du gène à transférer, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches obtenues à l'étape précédente.

L'invention concerne également un procédé de transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans le génome de cellules activées à partir d'un état de repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu de préstimulation contenant:

- \* des moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques, pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence environ 72 h, et est notamment inférieure à

environ 20 h et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

- \* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques comportant tout ou partie d'un gène hétérologue, tout ou partie du gène hétérologue provenant notamment d'un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus, produit par une culture productrice à laquelle a été additionné un agent viral, tel qu'un anti-TGF- $\beta$ , un anti-interféron ou tout agent permettant d'augmenter la production et/ou la stabilité du vecteur,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente.

S'agissant des cellules souches, elles sont éventuellement remises à l'état de repos après l'étape de transfert.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, le milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue est constitué par, ou comprend: DMEM (milieu de Eagle modifié par Dubelcco), et éventuellement IMDM (milieu d'Iscoe modifié par Dubelcco), des cytokines, et éventuellement un antagoniste du TGF- $\beta$  tel que défini ci-dessus, des anti-interférons, ou tout autre agent viral, permettant d'augmenter la production et/ou la stabilité du vecteur viral ou du rétrovirus, contenant le gène à transfecter, lorsque le transfert de tout ou partie du gène hétérologue se fait par coculture des cellules souches et du vecteur viral, ou du rétrovirus.

Lorsque le transfert se fait en utilisant un surnageant de la culture contenant le vecteur, le titre du vecteur produit par la culture productrice peut être avantageusement augmenté en ajoutant à la culture productrice du vecteur, un anti-TGF- $\beta$  ou un anti-interféron ou tout autre agent susceptible d'augmenter la production et/ou la stabilité du vecteur.

L'invention concerne également un procédé permettant d'augmenter le titre d'un vecteur, tel qu'un vecteur viral, ou un rétrovirus, lequel vecteur est produit par une culture productrice, par addition à ladite culture d'un agent viral

tel qu'un anti-TGF- $\beta$ , un anti-interféron, ou de tout agent stabilisateur de vecieur

A l'issue de l'étape du transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans les cellules souches, les cellules souches comportant dans leur génome tout ou partie d'un gène hétérologue peuvent être placées dans un milieu approprié, notamment un milieu liquide ou un milieu semi-solide, afin de se multiplier et de se différencier en des cellules hématopoïétiques différenciées, notamment en cellules différenciées du sang.

Comme exemple de cellules différenciées, on peut citer les granulocytes, les monocytes, les mégacaryocytes, les érythrocytes.

A l'issue de l'étape de transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans les cellules hématopoïétiques, on peut envisager avantageusement une étape de remise à l'état de repos des cellules souches hématopoïétiques contenant tout ou partie du gène hétérologue, cette étape pouvant être effectuée à l'aide d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, tel que le TGF- $\beta$ .

Plus précisément, pour remettre les cellules souches au repos (c'est-à-dire en phase Go), après transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue, on peut procéder de la façon suivante.

L'intérêt de la méthode de l'invention sur toutes les autres méthodes tient au fait que l'activation de la cellule au repos se fait dans un laps de temps extrêmement court (de l'ordre de 1 à 72 heures, de préférence 6 à 12 heures à partir de la fin de l'étape de préstimulation) grâce à une synchronisation de la sortie de la phase Go pour toutes les cellules au repos lors de l'étape de préstimulation du procédé de l'invention tel que décrit ci-dessus. Cela permet de remettre les cellules transfectées en phase Go, après le transfert par addition de TGF- $\beta$ . Ceci garantit que pendant le transfert de gène(s) les cellules souches n'ont pas perdu leur potentiel hématopoïétique, dans la mesure où le nombre de division n'est pas supérieur à 1 ou 2.

Le gène hétérologue dont tout ou partie est introduit dans le génome de cellules souches hématopoïétiques peut être choisi parmi les gènes suivants: marqueurs: Neo (gène de résistance à la néomycine), CD2 (antigène leucocytaire), nls-LacZ, ou des gènes corrigeant une hémopathie ou tout autre pathologie telle que ADA (gène de l'adénosine déaminase), ALDP (gène corrigeant l'adrénoleucodystrophie), TK (gène suicide permettant de tuer des cellules en présence d'acyclovir sous le contrôle de promoteurs viraux), cette liste n'étant pas limitative.

Les méthodes actuelles de transfert de gène, ne permettent pas de transfecter le compartiment de la cellule souche de façon à ce que les lignages

lymphoïdes soient transfectés de façon satisfaisante. Or, ceci est important si l'on veut que la thérapie cellulaire soit applicable au traitement du SIDA ou de pathologies concernant les cellules B (lymphomes etc. ...). Le procédé de transfert de l'invention permet effectivement le transfert dans les lignages B et T, ce qui peut être vérifié en utilisant les deux modèles suivants permettant d'étudier le développement du compartiment de la cellule souche:

- des souris SCID humanisées (McCune J.M., Namikawa R., Weilbaecher K.N., Kaneshima H., Schultz L.D., Lieberman M., et Weissman I.L.: "The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function". *Science*, **241**: 1632, 1988).

- des cultures d'épithélium thymique (Plum J., De Smedt M., Defresne M.-P., Leclercq G., et Vandekerckhove B.: "Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate to T cells in a mouse thymic microenvironment" *Blood* **84**: 1587-1593, 1994).

Ces méthodes permettent d'obtenir dans le premier cas, tous les lignages y compris B et T, dans le deuxième cas, le lignage T.

Les milieux utilisés pour permettre la division du compartiment de la cellule souche une fois activée pour sortir de la phase G<sub>0</sub>, doivent respecter l'expression des récepteurs de la cellule souche selon des recommandations publiées dans Hatzfeld A. et al., *Hématol.*, 1993, **35**: 281-283, et dans Panterne et al., *J. Cell. Physiol.*, **91**, 1481:1489.

Le procédé de l'invention permet notamment:

- d'augmenter le titre d'un vecteur contenant tout ou partie d'un gène hétérologue à transfecter, notamment dans des cellules souches hématopoïétiques,

- de transférer tout ou partie d'un gène dans des cellules au repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques, dans lesquelles, jusqu'à présent un tel transfert était aléatoire;

- d'améliorer l'efficacité de transfert dans les progéniteurs hématopoïétiques précoces tels que CFU-GEMM, LTC-IC (cellule initiateur de culture à long terme: long term culture-initiating cell), HPP-Q (High Proliferative Potential Quiescent cells = cellules au repos à haut potentiel prolifératif) et progéniteurs lymphoïdes à fort potentiel prolifératif considérés comme "le compartiment de la cellule souche" par rapport au transfert déjà réalisé en mettant en oeuvre les procédés de l'art antérieur;

par exemple, la méthode permettra un transfert dans plus de 95% des CFU-GEMM pouvant se développer en colonies contenant plus de 10<sup>5</sup> cellules, les milieux Stem GEM\* distribués par le CNRS permettant d'évaluer de telles



cellules du compartiment de la cellule souche, les souris SCID (souris immunodéficientes: severe combined immunodeficiency) humanisées et des systèmes de cultures stromales ou d'épithélium thymique (référéncées ci-dessus) permettant d'évaluer le transfert dans tout le compartiment de la cellule souche;

- d'améliorer la stabilité de l'expression au cours du développement des cellules souches et des progéniteurs (amplification et différenciation), des gènes marqueurs pouvant être utilisés pour suivre et évaluer cette expression (exemple: nls-Lac-Z).

L'invention concerne également un procédé permettant d'évaluer la maturité ou l'immaturité de cellules souches, avant et/ou après le transfert de gènes.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé de détermination du degré de maturité de cellules souches, notamment hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- on effectue la culture d'un premier ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, dans un milieu approprié à leur culture, mais ne contenant pas de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, pendant environ 14 à environ 28 jours, de préférence 18 jours,

- on effectue la culture d'un deuxième ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, de même nature et de même degré de maturité que celles mentionnées ci-dessus, dans un milieu approprié contenant des moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, ces moyens de blocage étant présents, dans le milieu de culture à une concentration efficace (à condition de ne pas être diluée plus de 4 fois par rapport à la concentration optimale), pendant une période n'excédant pas 72 h, et n'excédant pas de préférence environ 36 h, et est de préférence d'environ 1 à 15 h et de préférence encore, de 1 à 10 h, cette culture ayant lieu pendant la même durée que celle du premier ensemble de cellules souches,

- on compare, 18 jours après la mise en culture de chacun des deux ensembles de cellules souches, le nombre et la nature des colonies. la différence des sommes des colonies à haut potentiel prolifératif (HPP-CFC = cellule formant une colonie à haut potentiel prolifératif, HPP-MEG = mégacaryocyte à haut potentiel prolifératif, HPP-GEMM = granulocyte érythrocyte monocyte mégacaryocyte à haut potentiel prolifératif) respectivement entre celle du deuxième ensemble et celle du premier ensemble correspondant aux colonies HPP-Q.

La concentration optimale d'oligonucléotides anti-sens peut être d'environ 0,001  $\mu$ M à environ 100  $\mu$ M, de préférence inférieure à environ 10  $\mu$ M.

La concentration optimale en anticorps bloquants peut être d'environ 0.01 µg/ml à environ 100 µg/ml, de préférence 1 µg/ml.

S'agissant de la culture en présence de moyens de blocage d'un inhibiteur du cycle cellulaire, à l'issue de la période n'excédant pas 72 h, et n'excédant pas de préférence environ 36 h, et qui est de préférence d'environ 1 à 15 h et de préférence encore, de 1 à 10 h :

- soit on peut laver les cellules pour éliminer substantiellement les sus-dits moyens de blocage,

- soit on peut diluer les sus-dits moyens de blocage à une concentration telle qu'ils soient sans effet prolifératif sur des cellules plus matures (c'est-à-dire progéniteurs déjà activés).

"L'évaluation de la maturité ou de l'immaturité de cellules souches" correspond à l'observation suivante.

Après 18 jours, on observe au microscope le nombre et la nature des colonies: on compte le nombre de colonies mixtes constituées de cellules de la lignée rouge et d'un ou plusieurs types de cellules de la lignée blanche. Le nombre de colonies mixtes est plus élevé lorsque la population cellulaire mise en culture est plus immature, c'est-à-dire constituée de cellules plus jeunes dont certaines sont au repos. D'autre part, plus la cellule qui a donné naissance à la colonie est immature, voir au repos, plus son potentiel de prolifération est grand, donc la colonie provenant de cette cellule une fois activée sera plus importante en taille.

Ce test sera également désigné dans la suite par test HPP-Q.

Pour ce faire, on compare une culture de cellules souches dans un milieu semi-solide ou liquide ne contenant pas d'anti-inhibiteur du cycle cellulaire avec la même culture de cellules souches dans un milieu semi-solide ou liquide contenant un anti-inhibiteur du cycle cellulaire, par exemple de l'anti-TGF-β.

Les conditions de culture dans le milieu ne contenant pas d'anti-inhibiteur de cycle cellulaire peuvent utiliser l'IL1, l'IL2, l'IL3, l'IL4, l'IL5 l'IL6, l'IL7, l'IL11, le G-CSF, le GM-CSF, le SF, le FL, le FGF, l'insuline, l'érythropoïétine, la thrombopoïétine ou d'autres cytokines qui coopèrent ou synergisent avec les précédentes.

Les conditions de culture dans le milieu contenant un anti-inhibiteur du cycle cellulaire par exemple l'anti-TGF-β sont les suivantes : l'anti-TGF-β n'a été ajouté qu'en préstimulation pendant 10 heures dans un faible volume de culture liquide contenant les cellules au repos telles les cellules CD34+CD38- (1 à 10% des CD34+ les plus immatures). Le volume de cette préculture est de 1/6 environ du volume final. Cette préculture est ensuite ajoutée à de la

méthylcellulose avec des cytokines non additionnées d'anti-TGF- $\beta$ , pour aboutir au volume final.

Une simplification de cette procédure consiste à mettre l'anti TGF- $\beta$  immédiatement dans la culture finale à des concentrations qui ne lui permettent d'être actif que pendant les premières heures de la culture, de préférence pendant les 10 premières heures.

Dans ces conditions, on observe de nouvelles colonies plus grosses que les précédentes, dérivées de cellules appelées High Proliferative Potential Quiescent Cells ou HPP-Q qui se développent sur 18 jours et non pas seulement sur 8, 10, 12 ou 14 jours comme on l'observe sans préstimulation par l'anti-TGF- $\beta$ . L'anti-TGF- $\beta$  n'a donc pas besoin d'être présent pendant toute la durée de la culture. S'agissant de la taille des colonies, elle peut être déterminée par comptage au microscope sur une lame de Mallasez, après prélèvement et dispersion de la colonie dans un volume connu de milieu liquide ; cette méthode permet d'évaluer le nombre de cellules constituant la colonie.

Que le test soit fait en milieu liquide, clonal ou non clonal, on compare les clones ou les populations dans les deux types de culture.

S'il s'agit des HPP-Q, elles constituent un élément du compartiment de la cellule souche et, quant à leur phénotypage, il s'agit de CD34+ Kit Low IL6-R low.

S'agissant des milieux de culture, on peut utiliser tout milieu approprié pour les cellules CFU-GEMM et permettant également le développement des cellules lymphoïdes.

La composition des milieux de culture semi-solide peut être telle qu'elle est décrite dans le chapitre 12, inclus dans le livre intitulé "Culture of Hematopoietic cells, R.I. Freshney, I.B. Pragnell, M.G. Freshney ed, Wiley-Liss" pp. 205-221. Le titre du chapitre est "Purification and in vivo assay of early human hematopoietic progenitors" J. Hatzfeld, P. Batard, A.A. Cardoso, M.L. Li, A. Hatzfeld.

Conformément à l'invention, on peut évaluer la maturité ou l'immaturité des cellules souches après le transfert de gènes. Cette évaluation se fait comme indiqué ci-dessus, à partir des colonies les plus grosses pour lesquelles on vérifie simultanément à la susdite évaluation d'immaturité, qu'il y a bien eu transfert de gènes, comme indiqué ci après dans l'exemple 1.

L'invention concerne notamment un procédé de transfert de gènes dans la cellule souche hématopoïétique dans lequel on évalue l'immaturité des cellules souches avant le transfert de gène, et avantageusement après le transfert de gènes.

Ce procédé peut comprendre les étapes suivantes :

1- Evaluation des cellules hématopoïétiques à greffer pour s'assurer qu'elles contiennent des cellules immatures désignées ci-dessus par HPP-Q, élément du compartiment de la cellule souche. Il est en effet inutile de procéder à un transfert de gènes si les cellules utilisées ne sont pas les bonnes. Par le procédé d'évaluation de l'immaturité des cellules souches, on peut comparer une culture dans un milieu semi-solide ou liquide, sans anti-inhibiteur du cycle cellulaire avec la même culture en présence d'un anti-inhibiteur. La différence du nombre de colonies doit mettre en évidence l'apparition de nouvelles colonies plus grosses que les précédentes, dérivées de cellules HPP-Q.

2- Préstimulation des cellules hématopoïétiques avec un milieu contenant un activateur du cycle cellulaire (10 heures pour un anti-TGF- $\beta$ ), pour sortir les cellules hématopoïétiques de la phase de repos, c'est-à-dire pour les activer.

3- Transfert de gènes avec un surnageant viral ou en coculture avec des cellules productrices de virus dans un milieu contenant un anti-interferon et/ou un anti-TGF- $\beta$ .

4- Après le transfert de gènes, les cellules hématopoïétiques activées devraient pouvoir être remises au repos (phase Go) dans un milieu de désactivation contenant un inhibiteur de cette cellule (TGF- $\beta$  dans le cas de la cellule souche hématopoïétique).

5- Alternativement, les cellules activées ayant subi un transfert de gènes ou non, peuvent être amplifiées pour être réinjectées in vivo. Ceci peut être réalisé avec une sous-population des cellules à réinjecter pour empêcher l'aplasie qui précède généralement la reprise d'une greffe.

6- Avant ou après réinjection des cellules, il est nécessaire de faire un test HPP-Q, suivi d'une coloration in situ ou d'une RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction = transcriptase inverse- amplification en chaîne par polymérase) des colonies obtenues pour évaluer le transfert de gènes.

Comme milieu de préstimulation et avant le transfert de gènes, on peut utiliser des milieux de culture liquide tels que ceux décrits dans l'article de Cardoso et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, pp. 8707-8711, September 1993).

Le procédé de l'invention permet d'évaluer le nombre de cellules primitives au repos (HPP-Q) avant le transfert de gènes, pour déterminer la richesse en cellules souches, ou après le transfert de gènes, pour déterminer l'efficacité du transfert de gènes dans le compartiment de la cellule souche.

### Description des figures.

La figure 1 représente une colonie CFU-GEMM exprimant de façon stable le gène nls-Lac-Z mis en évidence par la coloration X Gal.

La figure 2 représente à plus fort grossissement, un groupe de cellules érythroïdes de la colonie CFU-GEMM avec une expression du gène nls-lacZ homogène dans toutes les cellules.

La figure 3 montre la localisation nucléaire de la  $\beta$ -galactosidase dans les macrophages et l'absence de coloration non spécifique dans le cytoplasme.

### EXEMPLE 1: TRANSFERT DU GENE NLS-LACZ DANS DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES.

#### Matériel et méthodes.

#### Facteurs de croissance hématopoïétique et antisérum.

L'interleukine 3 (IL3) humaine recombinante, l'interleukine 6 (IL6) humaine recombinante, le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) humain recombinant et le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) humain recombinant sont fournis par Genetics Institute (Cambridge, MA). L'érythropoïétine humaine recombinante est fournie par AMGEN (Thousand Oaks, CA), et le SF (Steel factor) humain recombinant provient d'IMMUNEX (Seattle, WA). Les activités spécifiques de ces cytokines sont respectivement:  $2,3 \times 10^6$  U/mg,  $4 \times 10^6$  U/mg,  $9,3 \times 10^6$  U/mg,  $7 \times 10^4$  U/mg,  $4,98 \times 10^5$  U/mg et  $10^6$  U/mg. L'antisérum bloquant de dinde, anti-TGF- $\beta$ , est un don du Dr. A.B. Roberts et du MB Sporn (Danielpour, D., Dart, L. L., Flanders, K. C., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1989) J. Cell. Physiol. 138, 79-86):  $1 \mu\text{l}$  peut neutraliser 4 ng de TGF- $\beta$ . Il est utilisé à la concentration de  $4,2 \mu\text{l/ml}$ .

#### Purification de cellules CD34+

Par cellules CD34+, on désigne des cellules portant l'antigène membranaire CD34 et comprenant une sous population qui représente le compartiment de la cellule souche.

### FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

### Récupération de sang de cordon ombilical.

Des échantillons de sang de cordon ombilical humains sont récupérés à partir de cordon ombilical/placenta immédiatement après la naissance, tandis que le placenta reste *in situ* (Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., & Boyse, E. A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3828-3832; Gluckman, E., Devergie, A., Thierry, D., Eperou-Bourdeau, H., Traineau, R., Gerrota, J., Brossard, Y., Van Nifterik, J., & Benbunan, M. (1992) Bone Marrow Transplant. 9, 114-117).

### Purification de cellules SBA-CD34+

Les cellules mononucléaires sont obtenues comme décrit précédemment (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clarck, S.C., & Hatzfeld, A. (1991) J. Exp. Med. 174, 925-929). Très brièvement après l'isolation de cellules mononucléaires sur du Ficoll Hypaque, les cellules SBA- (cellules ne se fixant pas à l'agglutinine de soja) sont purifiées en éliminant les cellules restées attachées à l'agglutinine de soja immobilisée de façon covalente en utilisant la procédure AIS, (procédure mise au point par la firme Applied Immune Sciences). (BSA CELLector Flasks, Applied Immune Sciences Inc. Santa Clara, CA). La sélection positive de CD34+ est obtenue avec des flacons de culture recouverts d'anticorps monoclonaux CD34 ICH3 (CD34 CELLector Flasks, AIS), lavées un nombre suffisant de fois (jusqu'à 10 fois) avec une solution saline tamponnée de phosphate Dulbecco, contenant 1 mM d'EDTA pour assurer l'élimination des cellules non attachées et faiblement attachées (CD34+faible) comme observé sur le microscope inversé (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A.A., Li M.-L., et Hatzfeld A. Purification and *in vitro* assay of early human hematopoietic progenitors. 205-221. Dans Culture of Hematopoietic Cells. Freshney R.L., Pragnell I.B., Freshney M.G., 1994).

Cette procédure donne de façon routinière une pureté de 95% ( $\pm 3\%$ ) de cellules CD34. Les cellules isolées CD34+SBA- sont ensuite détachées par une incubation de 2 heures à 37°C dans du milieu d'Iscoe modifié par Dulbecco (IMDM) additionné de sérum de veau foetal (FCS) à 10% ou dans du milieu Stem GEM\* du CNRS (milieu sans sérum). Le détachement des cellules doit être complet, étant donné que les cellules qui expriment une quantité élevée

d'antigènes CD34 représentent les progéniteurs les plus immatures et sont les plus difficiles à détacher.

#### Composition des milieux

Les milieux de préstimulation et de transfert sont des milieux Stem GEM\* avec ou sans sérum (CNRS Centre National de la Recherche Scientifique UPR 9044 Villejuif France).

#### Procédé de transduction

La lignée de cellules NB16, une lignée de cellules (Danos O., et Mulligan R.C.: "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges". Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 6460-6464, 1988) qui exprime la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* (Strair, R. K., Towle, M., & Smith, B. R. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 47-4762) est fournie par J.M. Heard et O. Danos. Ces cellules sont maintenues en culture dans du milieu DMEM additionné de 10% sérum de veau nouveau né enrichi en fer (Hyclone). Cette lignée cellulaire produit un surageant avec un titre viral habituel de 1 à  $5 \cdot 10^5$  unités/ml. Les cellules CD34+ sont préstimulées pendant des temps variés (50 000 cellules de CD34+ dans 0.5 ml). Elles sont ensuite mises en co-culture pendant 40 h sur des cellules NB16 à 40% de confluence dans du milieu StemGEM\* (CNRS) additionné de polybrène à 8  $\mu$ l/ml à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans une atmosphère saturée en humidité. Les cellules de CD34+ sont ensuite doucement détachées, concentrées et testées pour des essais clonogéniques.

#### Essais clonogéniques dans la méthylcellulose.

Les cellules CD34+ sont cultivées à raison de 300-400 cellules/ml selon une modification d'un test de colonie mixte de Fauser et Messner (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clarek, S.C., & Hatzfeld, A. (1991) J. Exp. Med. 174, 925-929; Fauser, A. A., & Messner, H. A. (1979) Blood 53, 1023). Toutes les cultures sont faites au moins en double.

### Coloration des colonies transduites.

Après une incubation de 14 à 21 jours à 37°C dans une atmosphère humidifiée saturée, les colonies sont comptées et classifiées comme décrit de façon antérieure (Zhou, Y.-Q., Stanley, E. R., Clark, S. C., Hatzfeld, J., Levesque, J.-P., Federici, C., Watt, S. M., & Hatzfeld, A. (1988) *Blood* 72, 1870-1874). Elles sont ensuite colorées par la même méthode histochimique que celle utilisée pour évaluer le titre d'un surnageant, avec X-Gal comme substrat (MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (1991) *Methods Mol. Biol.* 7, 217-235) à l'exception du fait que la solution de coloration (1 ml/boîte de Petri) est deux fois plus concentrée que pour les cellules adhérentes. La réaction de coloration est effectuée toute la nuit.

### Analyse statistique.

La signification de différences entre les groupes de traitement est déterminée en utilisant le test *t* de Student.

### Résultats.

L'efficacité d'infection de nls-lacZ dépend d'une période de préstimulation de 10 h avec l'anti-TGF- $\beta$ .

Les cellules SBA-CD34<sup>+++</sup> (cellules CD34 les plus immatures) sont purifiées avec une récupération élevée de cellules du compartiment de la cellule souche dont font partie les CFU-GEMM (colony-forming unit - granulocyte/erythrocyte /macrophage /megacaryocyte) ayant un potentiel de prolifération élevé (supérieur à 10<sup>5</sup> cellules) comme décrit dans Matériel et méthodes. Ces cellules sont préincubées pendant des temps variés avec ou sans sérum anti-TGF- $\beta$  comme détaillé dans le tableau 1 avant la co-culture avec des cellules NB16 pour infection par des vecteurs rétroviraux. Lorsque ces cellules sont préstimulées pendant 10 h avec uniquement des cytokines et sans anti-TGF- $\beta$  avant la transduction, l'efficacité de transfert augmente de 1,1 à 23,8%. Cette augmentation double de façon significative en présence de sérum anti-TGF- $\beta$ , s'élevant de 23,8 à 47,3%. L'efficacité d'activation de l'anti-TGF- $\beta$  disparaît pendant des temps de préincubation plus longs. Des périodes de préstimulation de 20 ou 48 h, ou plus longues (non représentées), avec ou sans sérum anti-TGF- $\beta$  fournissent des résultats similaires comme ceux observés après 10 h sans sérum anti-TGF- $\beta$ .



Effet d'anti-TGF- $\beta$  sur l'efficacité de transfert de nls-lacZ dans les différents types de progéniteurs.

Etant donné qu'une préstimulation de 10 h en présence de sérum anti-TGF- $\beta$  donne une augmentation significative du nombre total de colonies transduites, on a utilisé cette condition de préstimulation dans les expériences suivantes. Le tableau 2 détaille les types variés de progéniteurs qui sont transduits avec cette méthode et l'efficacité relative d'expression pour chacun d'eux. L'efficacité d'expression la plus élevée est obtenue avec les progéniteurs les plus immatures qui sont les colonies mixtes provenant de CFU-GEMM. Ces progéniteurs donnent des colonies contenant 1 à  $2 \times 10^5$  cellules. La figure 1 montre une telle colonie. La figure 2 représente des cellules érythroïdes avec une expression du gène nls-Lac-Z homogène dans toutes les cellules. La figure 3 détaille de façon plus précise la localisation nucléaire de  $\beta$ -galactosidase dans les macrophages et prouve l'absence de coloration non spécifique dans le cytoplasme. La préstimulation par l'anti-TGF- $\beta$  augmente l'efficacité de transfert de 54,5 à 95% dans les CFU-GEMM (colony-forming unit - granulocyte/ erythrocyte/macrophage /megacaryocyte), de 43,8 à 66,2% dans les BFU-E (burst-forming unit - erythroïde), de 3,5 à 13,5% dans les CFU-GM (colony-forming unit - granulocyte /macrophage), de 0 à 9,3% dans CFU-G (colony-forming unit - granulocyte) et de 8,3 à 22,2% dans les CFU-M (colony-forming unit - macrophage). (L'efficacité de transfert est augmentée par rapport aux conditions de transfection de CFU-GEMM sans TGF- $\beta$ ).

La préstimulation par l'anti-TGF- $\beta$  augmente la stabilité de l'expression du gène pendant le développement des CFU-GEMM.

Etant donné que les CFU-GEMM représentent une sous-population du compartiment de la cellule souche qui prend part à la reconstitution hématopoïétique à long terme (Lu, L., Xiao, M., Shen, R.-N., Grisby, S., & Broxmeyer, H. E. (1993) Blood **81**, 41-48), on a analysé la stabilité de l'expression du gène pendant le développement des CFU-GEMM en colonies mixtes. Dans le tableau 3, les CFU-GEMM sont classés selon le pourcentage de cellules exprimant nls-lacZ, à l'intérieur de chacune des colonies. La préstimulation par du sérum anti-TGF- $\beta$  augmente le nombre de colonies contenant de 90 à 100% de cellules exprimant le gène nls-lacZ. Ce type de CFU-GEMM ne se développe pas dans les cultures de cellules qui ne sont pas préstimulées par un sérum anti-TGF- $\beta$ . Au contraire, cette sous-population

représente 41,2% de toutes les CFU-GEMM transduites après la préstimulation par du sérum anti-TGF- $\beta$ .

On a déterminé si la taille des colonies est modifiée par le transfert de gènes. On observe que le nombre de cellules n'est pas différent de façon significative dans les colonies transduites par nls-lacZ par rapport à celles qui ne le sont pas.

**Tableau 1. Le sérum anti-TGF- $\beta$  ajouté pendant une préstimulation de 10 h augmente l'efficacité de transfert de gène.**

Heures	Antisérum anti-TGF- $\beta$	Nombre total de colonies	Colonies transfectées	% de transfert
0	-	103 ( $\pm$ 16)	1 ( $\pm$ 0)	1.1 ( $\pm$ .05)
	+	94 ( $\pm$ 18) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.330	2 ( $\pm$ 2) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.028	1.54 ( $\pm$ .4) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.128
10	-	74 ( $\pm$ 19)	15 ( $\pm$ 5)	23.8 ( $\pm$ 9.0)
	+	125 ( $\pm$ 15) <i>df</i> = 3; <i>p</i> = 0.001	51 ( $\pm$ 10) <i>df</i> = 3; <i>p</i> = 0.0004	24.8 ( $\pm$ 2.09) <i>df</i> = 3; <i>p</i> = 0.034
20	-	110 ( $\pm$ 7)	24 ( $\pm$ 5)	23.5 ( $\pm$ 1.66)
	+	140 ( $\pm$ 4) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.015	35 ( $\pm$ 4) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.085	24.8 ( $\pm$ 2.2) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.394
48	-	91 ( $\pm$ 15)	20 ( $\pm$ 6)	21.9 ( $\pm$ 3.7)
	+	113 ( $\pm$ 10) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.138	21 ( $\pm$ 4) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.440	18.7 ( $\pm$ 2.2) <i>df</i> = 2; <i>p</i> = 0.394

Le nombre de colonies est obtenu avec  $10^3$  cellules/ml mises en culture dans de la méthylcellulose comme décrit dans Matériel et Méthodes.

Tableau 2. Effet du sérum anti-TGF- $\beta$  sur l'efficacité de transfert dans différents types de progéniteurs hématopoïétiques.

Progéniteurs		% de transfert sans préstimulation par l'anti-TGF- $\beta$	% de transfert avec préstimulation avec l'anti-TGF- $\beta$
CFU-GEMM	Nombre total de colonies	11	21
	Colonies transfectées	6	20
	% de transfert	54.5	95
BFU-E	Nombre total de colonies	67	83
	Colonies transfectées	19	55
	% de transfert	43.8	66.2
CFU-GM	Nombre total de colonies	28	38
	Colonies transfectées	1	5
	% de transfert	3.5	13.5
CFU-G	Nombre total de colonies	21	43
	Colonies transfectées	0	4
	% de transfert	0	9.3
CFU-M	Nombre total de colonies	12	18
	Colonies transfectées	1	4
	% de transfert	8.3	22.2

CFU-GEMM : colony-forming unit - granulocyte/erythrocyte/  
macrophage/mégacaryocyte;

BFU-E : burst-forming unit - erythroid;

CFU-GM : colony-forming unit - granulocyte/macrophage;

CFU-G : colony-forming unit - granulocyte;

CFU-M : colony-forming unit - macrophage.

Ceci est le résultat d'une expérience parmi 3 expériences similaires.

Tableau 3. Distribution des CFU-GEMM transfectées selon la stabilité de l'expression du gène nls-Lac-Z pendant le développement de la colonie.

% de cellules exprimant le gène nls-Lac-Z dans chaque colonie mixte	Sans sérum anti-TGF- $\beta$		Avec sérum anti-TGF- $\beta$	
	% de colonies mixtes	Nombre de cellules par colonie mixte	% de colonies mixtes	Nombre de cellules par colonie mixte
90-100	0	118 706 ( $\pm$ 16 300)	41,2	152 776 ( $\pm$ 18 336)
40-90	66,6	121 766 ( $\pm$ 10 821)	35,3	156 456 ( $\pm$ 19 069)
0-40	33,3	122 313 ( $\pm$ 13 590)	23,5	169 963 ( $\pm$ 16 919)

Les résultats représentent la moyenne ( $\pm$  SD) de 3 expériences indépendantes.

Tableau 4.

Effet de l'antisérum anti-TGF- $\beta$  et/ou de l'anti-interféron (IFN) sur le titre du surnageant produit par les cellules NB16.

Surnageant	Contrôle	Antisérum anti-IFN	Antisérum anti-TGF- $\beta$
CFU/10 <sup>-5</sup>	6 ( $\pm$ 4.4)	65.8 ( $\pm$ 68.7)	38.2 ( $\pm$ 42.02)
nombre d'expériences	(n=6)	(n=6)	(n=4)

Des cellules NB16 ont été cultivées en absence ou en présence d'anti-TGF- $\beta$  ou d'anti-interféron.

Les surnageants sont ensuite ajoutés à des cultures de cellules 3T3 non confluentes. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont colorées par le X-Gal et les foyers viraux sont comptés et le titre est exprimé par le nombre de

foyers viraux multiplié par l'inverse de la dilution du surnageant de départ (CFU : Colony Forming Unit).

L'addition d'anti-TGF- $\beta$  ou d'anti-interféron pendant la coculture peut augmenter le pourcentage de transfert (résultat non montré) dans les cellules hématopoïétiques par un effet direct sur la lignée productrice. Le tableau 4 montre, en effet, que lorsqu'on ajoute aux cellules NB16 de l'anti-TGF- $\beta$  ou un agent viral comme un anti-interféron, on augmente le titre du surnageant. En effet, le surnageant obtenu après traitement par l'anti-interféron augmente de 11 fois le nombre de foyers d'infection et avec l'anti-TGF- $\beta$ , il augmente de 6 fois.

## EXEMPLE 2

On donne ci-après les résultats obtenus dans des essais comparatifs de préstimulation avec ou sans anti-inhibiteur du cycle cellulaire.

But de l'expérience :

On souhaite sortir de la phase de repos des progéniteurs primitifs qui seraient sous le contrôle d'un TGF $\beta$  autocrine. Cette sortie est obtenue après un temps de stimulation court (10 heures) puis le phénomène est mis en évidence par mise en culture semi-solide des progéniteurs activés et lecture du nombre de colonies mixtes après 21 jours de culture (Fauser A.A. et Messner H.A. (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages, and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. Blood, 53:1023-1027).

Procédure expérimentale :

Purification des cellules CD34+ de sang de cordon ombilical.

Les cellules sont incubées dans 2 milieux de base différents :

A : milieu GTL

B : milieu liquide standard avec 10% de sérum de veau foetal.

La composition du milieu GTL est décrite dans l'article suivant "Specific role of lipids, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems" J. Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigné, M. Sasportes, R. Willis and D.B. Mc Clure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell proliferation vol. 9. Growth of Cells in hormonally defined media, 1982. pp. 703-710.

La composition du milieu GTL est la suivante:

IMDM : milieu de base

+ 1 mg/ml serum albumine bovine délipidée reconstituée avec 5  $\mu$ g/ml acide oléique, 5  $\mu$ g/ml acide linoléique, 1  $\mu$ g/ml acide palmitique,

+ transferrine 5 µg/ml ("Specific role of lipids, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems" J Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigné, M. Sasportes, R. Willis and D.B. Mc Clure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell proliferation vol. 9, Growth of Cells in hormonally defined media, 1982, pp. 703-710).

La composition du milieu standard est la suivante:

IMDM + 10% sérum de veau foetal  
1 mg/ml serum albumine bovine  
2 mM glutamine  
10 µg/ml transferrine  
 $4 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoéthanol.

A ces deux milieux de base sont ajoutées 6 au moins des cytokines suivantes : IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, GCSF, SF, EPO, GM-CSF, FL, TPO, FGF, insuline ou des synthokines activant les récepteurs correspondant à ces cytokines.

Dans chaque groupe de milieux A et B, on teste les conditions suivantes:

1) contrôle : rien d'autre n'est ajouté,

2) addition d'un anticorps anti-TGF $\beta$  provenant de Stem GEM\* CNRS, 7 rue Guy Môquet, 94801 Villejuif, FRANCE.

Les cellules sont mises à l'étuve pendant 10 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 1000 cellules dans 0,4 ml de milieu.

A la fin de la période de préstimulation, on ajoute 2,1 ml de milieu semi-solide aux cellules. On met en incubation pendant 21 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### Résultats :

Chaque chiffre représente la moyenne de deux boîtes. Ne sont présentés que les comptages des colonies mixtes (colonies constituées de cellules rouges + un ou plusieurs types de lignages de cellules blanches) qui proviennent des cellules les plus immatures.

	Exp A	Exp B	Exp C
Contrôle (1)	8	6	1
En présence d'anticorps anti-TGF $\beta$ (2)	15	12	4

## EXEMPLE 3:

Par ailleurs, on a vérifié que des combinaisons de facteurs plus élaborées que celles déjà utilisées n'ont pas un effet aussi efficace que l'anti-TGF $\beta$ .

On a comparé de nombreuses combinaisons de cytokines plus élaborées que les précédentes dans des cultures avec ou sans anti-TGF- $\beta$ . On observe que certaines combinaisons de cytokines peuvent avoir un effet semblable à l'effet de l'anti-TGF- $\beta$  sur les colonies qui se développent rapidement et donc proviennent de progéniteurs tardifs déjà activés. Par contre, l'effet de l'anti-TGF- $\beta$  ne peut être remplacé par aucune combinaison de cytokines pour le développement de colonies sur 18 jours.

Par ailleurs, s'il était connu que les cytokines induisent le récepteur amphotrope des rétrovirus utilisés pour un transfert de gènes, on a montré, grâce à l'invention, que l'anti-TGF $\beta$  augmente l'expression des récepteurs de cytokines, donc leur action, donc l'expression des récepteurs amphotropes, donc le transfert de gènes. L'augmentation de l'expression des récepteurs de cytokines pour l'anti TGF- $\beta$  est surtout nette sur les cellules au repos.

## EXEMPLE 4:

Expérience en condition de cultures unicellulaires (cellules CD34+CD38 faibles) comparant l'effet de FL/bFGF (Ligand Flik/facteur de croissance fibroblastique basique) et anticorps anti-TGF- $\beta$ 1(provenant de Stem GEM\*) dans le milieu suivant: milieu B: sérum /IL3/IL6/SF/GCSF) à J0, et milieu B+GMCSF+EPO à J12.

On a utilisé quatre conditions de milieu de culture :

1. milieu standard avec 24% sérum de veau foetal et 4 cytokines (IL3, IL6, SF, GCSF),
2. milieu standard avec 10% sérum de veau foetal et 4 cytokines (IL3, IL6, SF, GCSF) + FL/bFGF,
3. milieu standard + anticorps anti-TGF $\beta$  (provenant de Stem GEM\*).
4. milieu standard + FL/bFGF + anticorps anti-TGF- $\beta$  (provenant de Stem GEM\*).

Résultats :

Les quatre conditions donnent les résultats suivants :

- Pour la mise en cycle des cellules :

1. 50% des cellules donnent des clones de plus de 100 cellules,
2. 75% des cellules donnent des clones de plus de 100 cellules,

3. 75 % des cellules donnent des clones de plus de 100 cellules.

4. 75 % des cellules donnent des clones de plus de 100 cellules.

Il n'y a donc pas d'effet additif dans la combinaison 4)

1. Il semblerait que ce soit la même population qui soit en cause.

- Pour la prolifération, les conditions 2 et 3 donnent les résultats suivants :

2. 15-20 % des clones contiennent plus de  $10^4$  cellules.

3. 50 % des clones contiennent plus de  $10^4$  cellules.

Donc l'anticorps anti-TGF- $\beta$  est plus efficace que le FL/bFGF.

- Sur la nature des cellules obtenues :

. avec la combinaison 2, on obtient surtout des G et des M (cellules plus matures) c'est-à-dire des granulocytes et des monocytes,

. avec les combinaisons 3 et 4, on obtient surtout des cellules rouges et des mixtes (c'est-à-dire mélange de cellules rouges et de cellules blanches).

Donc l'anticorps induit la mise en cycle de cellules plus précoces puisque c'est seulement avec l'anticorps anti-TGF- $\beta$  qu'on stimule les voies érythroïdes ou mixtes.

L'ensemble de ces résultats permet de dégager les avantages du traitement court par l'anti TGF- $\beta$  selon l'invention.

Toutes les publications concernant le transfert de gènes insistent sur les deux paramètres importants d'un transfert efficace : un surnageant à titre viral élevé et la mise en cycle de la cellule à infecter. C'est la raison pour laquelle on stimule les cellules souches avec des cytokines. Dans les publications, la stimulation a lieu pendant plus de 72 heures et concerne des cellules déjà en cycle. Au bout de 72 heures, beaucoup de ces cellules ont déjà commencé à se différencier. Les cellules qui sont infectées sont donc beaucoup moins immatures qu'au départ. Avec l'anti-TGF- $\beta$ , et conformément au procédé de l'invention, les cellules sont stimulées un temps très court et sont des cellules initialement au repos. Elles n'ont eu que le temps d'entrer en cycle sans se différencier ou peu. Le procédé de l'invention permet de les remettre en phase de repos immédiatement après le transfert de gènes grâce à un court traitement par du TGF- $\beta$ . Par conséquent, les cellules qui sont transfectées sont plus immatures, ce qui est le but recherché en thérapie génique utilisant la cellule souche hématopoïétique. Ce procédé est applicable à d'autres types de cellules en utilisant éventuellement d'autres anti-inhibiteurs du cycle cellulaire (anti Rb : anti-gène de susceptibilité au rétinoblastome, anti INK : anti-inhibiteur de kinase, etc).

Ces anti-inhibiteurs peuvent être des oligonucléotides anti-sens, des anticorps bloquants, des inhibiteurs naturels ou de synthèse.



## REVENDECATIONS

1. Utilisation de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire pendant une durée n'excédant pas 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et notamment inférieure à environ 20 h, et de préférence d'environ 1 à 15 h, et de préférence d'environ 1 à 10 h, dans une culture de cellules souches, afin de libérer les cellules souches de leur état de repos.

2. Utilisation selon la revendication 1, de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire dans un test de comparaison, d'une part, entre une culture de cellules souches dans un milieu contenant les sus-dits moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire et, d'autre part, entre une même culture de cellules souches que celle mentionnée ci-dessus dans un milieu ne contenant pas de sus-dit moyen de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, afin de déterminer le degré de maturité des sus-dites cellules souches.

3. Utilisation selon la revendication 1, de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire dans une culture de cellules souches, afin de libérer les cellules souches de leur état de repos, suivie d'une étape de transfert de gènes dans les sus-dites cellules souches.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 dans laquelle les cellules souches sont des cellules hématopoïétiques et les moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire sont constitués par de l'anti TGF- $\beta$ .

5. Cellules, notamment cellules souches hématopoïétiques, contenant tout ou partie d'un gène hétérologue dans leur génome, susceptibles d'être obtenues selon le procédé comprenant les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et est

notamment inférieure à environ 20 h. et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

\* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment de cellules souches hématopoïétiques, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente.

6. Cellules souches hématopoïétiques contenant dans leur génome tout ou partie d'un gène hétérologue, et ayant un potentiel de multiplication égal ou supérieur à  $10^6$  et un potentiel de différenciation susceptible de couvrir tous les lignages hématopoïétiques.

7. Cellules, notamment cellules souches selon l'une des revendications 5 ou 6, comportant, à l'intérieur d'elles mêmes ou sur leur surface, des moyens de blocage de tout inhibiteur de leur cycle cellulaire.

8. Cellules, selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, à l'état de repos.

9. Cellules, notamment cellules souches hématopoïétiques selon l'une des revendications 5 à 8, dans lesquelles les moyens de blocage sont constitués par ceux choisis parmi: les anti-inhibiteurs du cycle cellulaire, par exemple des agents bloquant les gènes suppresseurs de tumeurs, des antagonistes du TGF- $\beta$  tels que des antisens du TGF- $\beta$ , des anticorps neutralisant le TGF- $\beta$ , des récepteurs solubles du TGF- $\beta$  ou des inhibiteurs naturels ou de synthèse du TGF- $\beta$ , ou des inhibiteurs de la voie de synthèse du TGF $\beta$ .

10. Cellules souches hématopoïétiques selon l'une des revendications 5 à 9, dans lesquelles tout ou partie du gène hétérologue peut être choisi parmi les gènes suivants: marqueurs: Neo (gène de résistance à la néomycine), CD2 (antigène leucocytaire), nls-Lac-Z, ou des gènes corrigeant une hémopathie ou

tout autre pathologie telle que ADA (gel de l'adénosine déaminase), ALDP (gène corrigeant adrénoleucodystrophie), TK (gène suicide permettant de tuer des cellules en présence d'acyclovir sous le contrôle de promoteurs viraux).

11. Procédé de transfert de tout ou partie d'un gène hétérologue dans le génome de cellules activées à partir d'un état de repos, notamment de cellules souches hématopoïétiques activées à partir d'un état de repos, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la préstimulation de cellules au repos, notamment des cellules souches hématopoïétiques au repos dans un milieu contenant:

- \* des moyens de blocage directs ou indirects d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire des dites cellules, notamment des dites cellules souches hématopoïétiques pendant une durée suffisante pour libérer les cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques de leur état de repos, et n'excédant pas de préférence 72 h, et n'excédant pas de préférence 36 h, et est notamment inférieure à environ 20 h, et est de préférence d'environ 1 h à 15 h, et de préférence d'environ 1 h à 10 h, et

- \* des substances, notamment des cytokines, pour permettre l'activation d'un cycle cellulaire et/ou ultérieurement la traversée d'au moins un cycle cellulaire,

- l'étape de transfert par la mise en présence des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente avec tout ou partie d'un gène hétérologue, dans un milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue dans le génome des cellules, notamment de cellules souches hématopoïétiques, pour obtenir des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques comportant tout ou partie d'un gène hétérologue,

- la récupération éventuelle des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques obtenues à l'étape précédente.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'étape de transfert de tout ou partie du gène hétérologue se fait avec une coculture de cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques, préstimulées selon la première étape de la revendication 11, et de cellules produisant un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus, contenant tout ou partie du gène à transférer.

13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'étape de transfert de tout ou partie du gène hétérologue se fait en mettant en présence de cellules.

notamment de cellules souches, préstimulées selon la première étape de la revendication 11, et du surnageant de cellules contenant un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus comprenant tout ou partie du gène à transférer.

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, dans lequel tout ou partie du gène à transférer provient d'un vecteur, tel qu'un vecteur viral ou un rétrovirus produit par une culture productrice à laquelle est additionné un agent viral, tel qu'un anti-TGF- $\beta$ , un anti-interféron ou tout agent stabilisateur de vecteur.

15. Procédé selon l'une des revendications 11 à 14, dans lequel le milieu de préstimulation comprend: IMDM (Iscove Dubecco Modified Medium), (Stem GEM\*) correspondant à un milieu commercialisé par le C.N.R.S.), des cytokines, des antagonistes du TGF- $\beta$  tels que des oligonucéotides antisens du TGF- $\beta$ , des anticorps neutralisants le TGF- $\beta$ , des récepteurs solubles du TGF- $\beta$  ou des inhibiteurs naturels ou de synthèse du TGF- $\beta$ , des anticorps neutralisants le TGF- $\beta$ , des récepteurs solubles du TGF- $\beta$  ou des inhibiteurs naturels ou de synthèse du TGF- $\beta$ , des combinaisons de cytokines susceptibles de bloquer dans un espace de temps court (inférieur à 72 h, de préférence inférieur à 10 h), les inhibiteurs du cycle cellulaire des cellules souches quiescentes.

16. Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, dans lequel les cytokines sont choisies parmi une combinaison d'au moins 4 cytokines choisies parmi les cytokines suivantes: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor), G-CSF, facteur Steel (SF), ligand de FLT3 (FL), érythropoïétine, TNF, LIF, thrombopoïétine, et insuline ou synthokines de synthèse.

17. Procédé selon l'une des revendications 11 à 16, dans lequel le milieu permettant le transfert de tout ou partie du gène hétérologue est constitué par, ou comprend: DMEM, et éventuellement IMDM, des cytokines, et éventuellement un antagoniste du TGF- $\beta$ , des anti-interférons, ou tout autre agent viral, permettant d'augmenter la production et/ou la stabilité du vecteur viral ou du rétrovirus, contenant le gène à transférer.

18. Procédé, selon l'une des revendications 11 à 17, comprenant à l'issue de l'étape du transfert de tout ou partie du gène hétérologue, la culture des cellules souches hématopoïétiques comportant dans leur génome tout ou partie

d'un gène hétérologue dans un milieu approprié, notamment un milieu liquide ou un milieu semi-solide, pour obtenir des cellules hématopoïétiques différenciées, notamment les cellules différenciées du sang.

19. Procédé selon l'une des revendications 11 à 17, comprenant à l'issue de l'étape de transfert de tout ou partie du gène hétérologue, une étape de remise à l'état de repos des cellules, notamment des cellules souches hématopoïétiques contenant tout ou partie du gène hétérologue, cette étape pouvant être effectuée à l'aide d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, tel que le TGF- $\beta$ .

20. Procédé permettant d'augmenter le titre d'un vecteur, tel qu'un vecteur viral, ou un rétrovirus, lequel vecteur est produit par une culture productrice, par addition à ladite culture d'un agent viral tel qu'un anti-TGF- $\beta$ , un anti-interféron, ou de tout agent stabilisateur de vecteur.

21. Procédé de détermination du degré de maturité de cellules souches, notamment hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- on effectue la culture d'un premier ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, dans un milieu approprié à leur culture, mais ne contenant pas de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, pendant environ 14 à environ 28 jours, de préférence 18 jours,

- on effectue la culture d'un deuxième ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, de même nature et de même degré de maturité que celles mentionnées ci-dessus, dans un milieu approprié contenant des moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du cycle cellulaire, ces moyens de blocage étant présents, dans le milieu de culture à une concentration efficace, pendant une période n'excédant pas 72 h, de préférence d'environ 1 à 15 h et de préférence encore, de 1 à 10 h, cette culture ayant lieu pendant la même durée que celle du premier ensemble de cellules souches,

- on compare, 18 jours après la mise en culture de chacun des deux ensembles de cellules souches, le nombre et la nature des colonies, la différence des sommes des colonies à haut potentiel prolifératif (HPP-CFC-HPP-MEG, HPP-GEMM) respectivement entre celle du deuxième ensemble et celle du premier ensemble correspondant aux colonies HPP-Q.

12

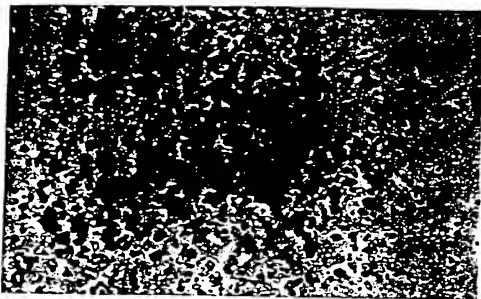


Figure 1

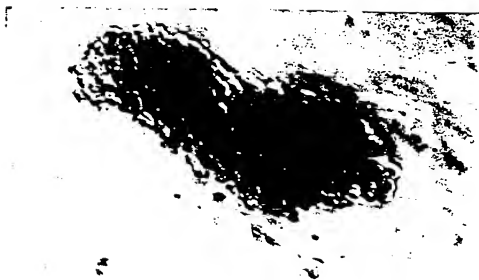


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26).



Figure 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Info: onal Application No.

PC1/FR 95/01691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N5/10 C12N5/08 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BLOOD (10 SUPPL. 1), vol. 84, 15 November 1994 - 1994, SAUNDERS, DULUTH, NEW YORK, US, page 126A XP002001961 A. HATZFELD ET AL.: "Release from quiescence of the human hematopoietic stem cell compartment: Application in early progenitor amplification and high efficiency gene transfer" Abstract submitted to the 36th annual meeting of the American Society of Hematology, Nashville, Tennessee, US, December 2-6, 1994. abstract no. 488, see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	5-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 3 May 1996		Date of making of the international search report 10.05.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

Form PCT/ISA/210 (annex sheet) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l. Application No.  
 PC1/FR 95/01691

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>J. CELL BIOCHEM. SUPPL. (17 PART E), vol. 0, 1993, WILEY-LISS, NEW YORK, US, page 249 XP002001962</p> <p>A. HATZFELD ET AL.: "Large scale gene transfer in early human hematopoietic progenitors" Keystone symposium on gene therapy, Keystone, Colorado, USA, April 12-18, 1993. see abstract</p> <p>---</p>	5-10
X	<p>BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 87, no. 1, 1994, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS; OXFORD, UK, page 97 XP002001963</p> <p>J. HATZFELD ET AL.: "Release from quiescence of the human hematopoietic stem cell compartment" Abstract of paper presented at the first meeting of the european haematology association, Brussel, Belgium, 2-5 June 1994; abstract no. 380 see abstract</p> <p>---</p>	5-10
X	<p>WO, A, 92 11355 (UNIV MICHIGAN) 9 July 1992 see the whole document</p> <p>---</p>	5
A	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 90, no. 18, 15 September 1993, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 8707-8711, XP002001964</p> <p>A. A. CARDOSO ET AL.: "Release from quiescence of CD34+CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults" cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-21
A	<p>LEUKEMIA, vol. 8, no. 3, March 1994, MACMILLAN PRESS LTD., UK, pages 441-445, XP002001965</p> <p>M.-L. LI ET AL.: "Additive effects of steel factor and antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotide on CD34+ hematopoietic progenitor cells" see the whole document</p> <p>---</p>	1-21

-/--

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of annex sheet) (July 1993)

page 2 of 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.  
 PL./FR 95/01691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
A	<p>BLOOD CELLS, vol. 20, 1994, SPRINGER VERLAG, NEW YORK, US, pages 430-435, XP002001966 J. HATZFELD ET AL.: "Purification and release from quiescence of umbilical cord blood early progenitors reveal their potential to engraft adults" see the whole document ---</p>	1-21
A	<p>J. EXP. MED., vol. 178, no. 2, 1 August 1993, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 529-536, XP002001967 T. MORITZ ET AL.: "Human cord blood cells as targets for gene transfer: Potential use in genetics therapies of severe combined immunodeficiency disease" cited in the application see the whole document ---</p>	1-21
A	<p>J. EXP. MED., vol. 178, no. 6, 1 December 1993, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 2089-2096, XP002001968 L. LU ET AL.: "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34+++ hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood" cited in the application see the whole document ---</p>	1-21
A	<p>COLLOQUE INSERM, vol. 229, 1993, JOHN LIBBEY EUROTEXT LTD., PARIS, FR, pages 283-289, XP002001969 J. HATZFELD ET AL.: "Antisense oligonucleotides for inhibitors and tumor suppressor genes reveal the hematopoietic potential of quiescent progenitors" Third international Conference, Paris, France, April 18-22, 1993 see the whole document ---</p>	1-21
A	<p>J. EXP. MED., vol. 174, October 1991, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 925-929, XP002001970 J. HATZFELD ET AL.: "Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta1 or Rb oligonucleotides" cited in the application see the whole document ---</p>	1-21

-/--

Form PCT/ISA/218 (continuation of annex sheet) (July 1992)

page 3 of 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.  
PLI/FR 95/01691

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE LANCET, vol. 340, no. 8810, 4 July 1992, THE LANCET LTD., LONDON, UK, pages 73-76, XP002001971 J.M. HOWS ET AL.: "Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures" cited in the application see the whole document ---	1-21
A	PROC. NATL.ACAD. SCI., vol. 88, no. 19, 1 October 1991, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 8377-8381, XP002001972 N. FERRY ET AL.: "Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo" see the whole document ---	1-21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 16, 25 August 1990, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 4759-4762, XP002001973 R.K. STRAIR ET AL.: "Retroviral mediated gene transfer into bone marrow progenitor cells: use of beta-galactosidase as selectable marker" cited in the application see the whole document ---	1-21
A	PROC. NATL.ACAD. SCI., vol. 85, no. 17, September 1988, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 6460-6464, XP002001974 O. DANOS ET AL.: "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotrophic and ecotropic host ranges" cited in the application see the whole document ---	1-21
A	WO, A, 93 25216 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 23 December 1993 see the whole document ---	1-21
P, X	BLOOD (1995), 86(5), 1729-35 CODEN: BLOOAH; ISSN: 0006-4971, 1995, XP000569752 SANSILVESTRI, PATRICIA ET AL.: "Early CD34high cells can be separated into KIThigh cells in which transforming growth factor- $\beta$ . (TGF- $\beta$ .) down modulates c-kit and KITlow cells in which anti-TGF- $\beta$ . upmodulates c-kit" see the whole document ---	1-21
	---	

Form PCT/ISA/216 (continuation of national sheet) (July 1992)

page 4 of 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.  
PLI/FR 95/01691

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>HUM. GENE THER. (1996), 7(2), 207-13 CODEN: HGTHE3; ISSN: 1043-0342, 1996, XP000569749 HATZFELD, A. ET AL: "Increased stable retroviral gene transfer in early hematopoietic progenitors released from quiescence" see the whole document -----</p>	1-21

Form PCT/ISA/219 (continuation of PCT/ISA/218) (July 1992)

page 5 of 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inv. Serial Application No.

PL 1/FR 95/01691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9211355	09-07-92	US-A- 5399493	21-03-95
		AU-B- 665525	11-01-96
		AU-B- 9175091	22-07-92
		CA-A- 2100268	18-06-92
		EP-A- 0575350	29-12-93
		JP-T- 6505151	16-06-94
		US-A- 5437994	01-08-95
-----			
WO-A-9325216	23-12-93	AU-B- 4402193	04-01-94
-----			

Form PCT/ISA/218 (patent family groups) (July 1993)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No  
PCT/FR 95/01691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N5/10 C12N5/08 A61K48/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation mutuelle consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation mutuelle dans la mesure où des documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BLOOD (10 SUPPL. 1), vol. 84, 15 Novembre 1994 - 1994, SAUNDERS, DULUTH, NEW YORK, US, page 126A XP002001961 A. HATZFELD ET AL.: "Release from quiescence of the human hematopoietic stem cell compartment: Application in early progenitor amplification and high efficiency gene transfer" Abstract submitted to the 36th annual meeting of the american society of hematology, Nashville, Tennessee, US, December 2-6, 1994. abstract no. 488, voir abrégé</p> <p>--- -/-</p>	5-10
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir le titre du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" documents découvrant l'état général de la technique, non considérés comme particulièrement pertinents</p> <p>"E" documents relatifs, mais publiés à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" documents pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"D" documents se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou sous autres moyens</p> <p>"P" documents publiés avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieurement publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinente, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  3 Mai 1996		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  10.05.96
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 3811 Patentshuis NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-3400, Tlx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Hornig, H

Formulaire PCT/ISA/210 (soumission flexible) (juillet 1993)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Der e Internationale No  
 PCT/FR 95/01691

Citation DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visées
X	J. CELL BIOCHEM. SUPPL. (17 PART E), vol. 8, 1993, WILEY-LISS, NEW YORK, US, page 249 XP002001962 A. HATZFELD ET AL.: "Large scale gene transfer in early human hematopoietic progenitors" Keystone symposium on gene therapy, Keystone, Colorado, USA, April 12-18, 1993. voir abrégé ---	5-10
X	BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 87, no. 1, 1994, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, UK, page 97 XP002001963 J. HATZFELD ET AL.: "Release from quiescence of the human hematopoietic stem cell compartment" Abstract of paper presented at the first meeting of the european haematology association, Brussel, Belgium, 2-5 june 1994; abstract no. 380 voir abrégé ---	5-10
X	WO, A, 92 11355 (UNIV MICHIGAN) 9 Juillet 1992 * en entier *	5
A	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 90, no. 18, 15 Septembre 1993, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US,; pages 8707-8711, XP002001964 A.A. CARDOSO ET AL.: "Release from quiescence of CD34+CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults" cité dans la demande * en entier * ---	1-21
A	LEUKEMIA, vol. 8, no. 3, Mars 1994, MACMILLAN PRESS LTD., UK, pages 441-445, XP002001965 M.-L. LI ET AL.: "Additive effects of steel factor and antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotide on CD34+ hematopoietic progenitor cells" * en entier * ---	1-21
	---	-/--

Formule PCT/ISA(21) (une ou la deuxième feuille) (juillet 1992)

page 2 de 5

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Internationale No  
PCT/FR 95/01691

C.(name) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BLOOD CELLS, vol. 20, 1994, SPRINGER VERLAG, NEW YORK, US, pages 430-435, XP002001966 J. HATZFELD ET AL.: "Purification and release from quiescence of umbilical cord blood early progenitors reveal their potential to engraft adults" * en entier *	1-21
A	J. EXP. MED., vol. 178, no. 2, 1 Août 1993, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 529-536, XP002001967 T. MORITZ ET AL.: "Human cord blood cells as targets for gene transfer: Potential use in genetics therapies of severe combined immunodeficiency disease" cité dans la demande * en entier *	1-21
A	J. EXP. MED., vol. 178, no. 6, 1 Décembre 1993, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 2089-2096, XP002001968 L. LU ET AL.: "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CO34+++ hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood" cité dans la demande * en entier *	1-21
A	COLLOQUE INSERM, vol. 229, 1993, JOHN LIBBEY EUROTEXT LTD., PARIS, FR, pages 283-289, XP002001969 J. HATZFELD ET AL.: "Antisense oligonucleotides for inhibitors and tumor suppressor genes reveal the hematopoietic potential of quiescent progenitors" Third international Conference, Paris, France, April 18-22, 1993 * en entier *	1-21
A	J. EXP. MED., vol. 174, Octobre 1991, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 925-929, XP002001970 J. HATZFELD ET AL.: "Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta1 or Rb oligonucleotides" cité dans la demande * en entier *	1-21

Formulaire PCT/ISA/210 (mise en la dernière feuille) (juillet 1992)



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 De la Internationale No  
 PCT/FR 95/01691

C (note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THE LANCET, vol. 340, no. 8810, 4 Juillet 1992, THE LANCET LTD., LONDON, UK, pages 73-76, XP002001971 J.M. HOWS ET AL.: "Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures" cité dans la demande * en entier * ---	1-21
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 88, no. 19, 1 Octobre 1991, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 8377-8381, XP002001972 N. FERRY ET AL.: "Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo" * en entier * ---	1-21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 16, 25 Août 1990, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 4759-4762, XP002001973 R.K. STRAIR ET AL.: "Retroviral mediated gene transfer into bone marrow progenitor cells: use of beta-galactosidase as selectable marker" cité dans la demande * en entier * ---	1-21
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 85, no. 17, Septembre 1988, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US., pages 6460-6464, XP002001974 O. DANOS ET AL.: "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotrophic and ecotrophic host ranges" cité dans la demande * en entier * ---	1-21
A	WO, A, 93 25216 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 23 Décembre 1993 * en entier * ---	1-21
P, X	BLOOD (1995), 86(5), 1729-35 CODEN: BLOODAW; ISSN: 0006-4971, 1995, XP000569752 SANSILVESTRI, PATRICIA ET AL.: "Early CD34high cells can be separated into KITHigh cells in which transforming growth factor- $\beta$ . (TGF- $\beta$ .) down modulates c-kit and KITlow cells in which anti-TGF- $\beta$ . upmodulates c-kit" voir le document en entier --- -/--	1-21

Formulaires PCT/ISA/210 (suite de la demande) (juillet 1993)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des le internationale Pro  
PCT/FR 95/01691

C.(viii) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visées
T	<p>HUM. GENE THER. (1996), 7(2), 207-13            CODEN: HGTHE3; ISSN: 1043-0342,            1996, XP000569749            HATZFELD, A. ET AL: "Increased stable            retroviral gene transfer in early            hematopoietic progenitors released from            quiescence"            voir le document en entier            -----</p>	1-21

Formulaire PCT/ISA/210 (note de la documentation No 686) (juillet 1993)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Résumé des résultats relatifs à : nombre(s) de familles de brevets

De : 4 Internationale No

PCT/FR 95/01691

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
W0-A-9211355	09-07-92	US-A- 5399493	21-03-95
		AU-B- 665525	11-01-96
		AU-B- 9175091	22-07-92
		CA-A- 2100268	18-06-92
		EP-A- 0575350	29-12-93
		JP-T- 6505151	16-06-94
		US-A- 5437994	01-08-95
-----			
W0-A-9325216	23-12-93	AU-B- 4402193	04-01-94
-----			

Formulaire PCT/ISA/210 (nouveau Schéma de brevets) (juillet 1992)

# Method for gene transfer into cells activated from a quiescent state

Patent Number: ☐ US5958774  
 Publication date: 1999-09-28  
 Inventor(s): HATZFELD JACQUES (FR); KLEIN ANTOINETTE (FR)  
 Applicant(s):: CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)  
 Requested Patent: ☐ WO9619567  
 Application Number: US19970860299 19970710  
 Priority Number(s): FR19940015497 19941222; WO1995FR01691 19951218  
 IPC Classification: C12N15/12 ; C12N5/10 ; C07K16/24 ; C07H21/04  
 EC Classification: C12N5/06B10P, C12N5/10  
 Equivalents: ☐ EP0800575 (WO9619567), ☐ FR2728534

## Abstract

PCT No. PCT/FR95/01691 Sec. 371 Date Jul. 10, 1997 Sec. 102(e) Date Jul. 10, 1997 PCT Filed Dec. 18, 1995 PCT Pub. No. WO96/19567 PCT Pub. Date Jun. 27, 1996A method is disclosed for gene transfer into a culture of primitive stem cells which comprises a prestimulation step of adding a blocking agent to block at least one inhibitor of a cell cycle of said primitive stem cells. The prestimulation is time-limited for a period of less than approximately 36 hours so that said culture of primitive stem cells retains hematopoietic potential.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## Description

### BACKGROUND OF THE INVENTION

Generally, the invention relates to a method for gene transfer into cells activated from a quiescent state, in particular hematopoietic stem cells, and the cells thus obtained.

### DESCRIPTION OF THE RELATED ART

Progress in the identification and cloning of genes that are responsible for human genetic diseases has led to a major program for the improvement of gene transfer technology (Anderson, W. F. (1992) *Science*, 256: 808-813; Miller, A. D. (1992) *Nature*, 357: 455-460; Morgan, R. A., & Anderson, W. F. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 191-217; Karlsson, S. (1991) *Blood*, 78: 2481-2492). For example, different viral vectors have been used for hematopoietic stem cells, each having their own advantage (Anderson, W. F. (1992), mentioned above). The insertion of a retroviral vector into the host genome ensures its replication in the host cell. This insertion requires an active proliferative state (Anderson, W. F. (1992), mentioned above; Varmus, H. E., Padgett, T., Heasley, S., Simon, G., & Bishop, J. M. (1977), *Cell*, 11: 307-319; Nolte, J. A., & Kohn, D. B. (1990) *Hum. Gene Ther.*, 1: 257-268; Miller, D. G., Adam, M. A., & Miller, A. D. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4239-4242) which does not exist in the compartment of the hematopoietic stem cell which is in a quiescent state (Lajtha, L. G., & Schofield, R. (1974) *Differentiation*, 2: 313-320), or in other types of stem cells and somatic cells such as the hepatic cells. Using antisense oligonucleotides against inhibitor gene, in particular TGF- $\beta$ -1, has shown that the early progenitors of human bone marrow can be released from their quiescent state by blockage of an autocrine TGF- $\beta$  (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S. C., and Hatzfeld, A. (1991), *J. Exp. Med.*, 174: 925-929).

Moreover, where transplants of hematopoietic tissue are concerned, in the past, the capacity for transplanting samples of bone marrow has been analysed by estimating the quantity of CFU-GM (colony-forming unit—granulocyte/macrophage: granulocyte-monocytic progenitor) cells. However, these cells which probably play an important part in cell generation for a short period following the transplantation of a graft may not reflect the quantity of more primitive cells, and in particular of hematopoietic stem cells which are important in long-term hematopoiesis. The stem cells involved in long-term transplants represent a small sub-population of cells which may possibly have the phenotype CD34+CD38- (compartment of the hematopoietic stem cell: cells rich in membrane antigen CD34 and poor in maturation membrane antigen CD38).

Recently, human cord blood has proved to be sufficient for reconstituting hematopoiesis after transplantation in children (Gluckman, E., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., & Boyse, E. A. (1989), *N. Eng. J. Med.*, 3: 1174-1178; Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hango, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Army, M., Thomas, L., & Boyse, E. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3828-3832; Broxmeyer, H. E., Hango, G., & Cooper, S. (1992) *Bone Marrow Transplant.*, 9: 7-10). In vitro, the data from various laboratories (Broxmeyer, H. E., Hango, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., & Broun, E. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4109-4113; Lu, L., Xiao, M., Shen, R.-N., Grisby, S., & Broxmeyer, H. E. (1993) *Blood*, 81: 41-48; Hows, J. M., Bradley, B. A., Marsh, J. C. W., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N. G., & Dexter, T. M. (1992) *Lancet*, 340: 73-76; Cardoso, A. A., Li, M. L., Batard, P., Hatzfeld, A., Brown, E. L., Levesque, J.-P., Sookdeo, H., Panterne, B., Sansivestri, P., Clark, S. C., & Hatzfeld, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8707-8711, suggesting that cord blood has a greater capacity for generating progenitors in culture than that of bone marrow, and consequently that cord blood could be sufficient to effect transplants of hematopoietic tissues onto adult recipients.

However, a rapid gene transfer into the whole (totality) of the compartment of the hematopoietic stem cell or of any other stem or somatic cell at rest (this state of rest also being called "quiescence" or as corresponding to the G<sub>0</sub> phase), has not been satisfactorily achieved to date.

### SUMMARY OF THE INVENTION

Gene transfer into cells activated from a quiescent state, in particular hematopoietic stem cells activated from a quiescent state, is one of the aspects of the invention.

The subject-matter of the invention is also quiescent cells, in particular quiescent hematopoietic stem cells, containing a heterologous gene.

The subject matter of the invention is also hematopoietic tissue containing a heterologous gene likely to form long-term grafts.

The invention relates to cells, in particular hematopoietic stem cells, containing in their genome all or part of a heterologous gene.

An object of the invention relates to the use for means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle for a period not exceeding 72 h (h: hours), and preferably not exceeding 36 h, and in particular less than 20 h, and preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h, in a culture of stem cells, in order to release the stem cells from their quiescent state.

According to an advantageous embodiment, an object of the invention is the use of means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle in a test comparing, on the one hand, a culture of stem cells in a medium which contains the aforementioned means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle and, on the other hand, the same culture of stem cells as that mentioned above in a medium which does not contain the aforementioned means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle, in order to determine the degree of maturity of the aforementioned stem cells.

According to another embodiment, an object of the invention is the use of means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle in a culture of stem cells, in order to release the stem cells from their quiescent state, followed by a step in which genes are transferred into the aforementioned stem cells.

Within the framework of the invention, the stem cells are advantageously hematopoietic cells and the means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle advantageously comprises anti-TGF- $\beta$ .

Another object of the invention relates to cells, in particular hematopoietic stem cells, containing all or part of a heterologous gene in their genome, which are likely to be obtained according to the method comprising the following steps:  
the prestimulation of quiescent cells, in particular of quiescent hematopoietic stem cells, in a medium containing:

direct or indirect means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle of the said cells, in particular of the said hematopoietic stem cells, for a period which is sufficient to release the cells, in particular the hematopoietic stem cells, from their quiescent state, and preferably does not exceed 72 h, and preferably does not exceed 36 h, and is in particular less than approximately 20 h, and is preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h, and substances, in particular cytokines, for permitting the activation of a cell cycle and/or subsequently the passage of at least one cell cycle,  
the step comprising transfer by contacting the cells, in particular the hematopoietic stem cells, obtained in the previous step, with all or part of a heterologous gene, in a medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene into the genome of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, in order to obtain cells, in particular hematopoietic stem cells, including all or part of a heterologous gene, and  
the possible recovery of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, obtained in the previous step.

Yet another object of the invention relates more particularly to hematopoietic Stem cells containing in their genome all or part of a heterologous gene and having an *in vitro* multiplication potential equal to or greater than  $10^6$  and a differentiation potential likely to cover all hematopoietic lineages.

Hematopoietic stem cells are defined as quiescent cells which can give rise to all hematopoietic lineages and to the cells deriving therefrom. Whatever the origin of the stem cells (fetal liver, fetal marrow, cord blood, adult marrow, peripheral blood), their proliferation potential is always very high: one cell giving rise to more than 1 to 20 times  $10^6$  cells *in vitro*. This number can be higher if new cytokines and bioreactors are used.

The hematopoietic stem cells can come from samples of bone marrow originating in a puncture of the iliac crest on bone marrow donors.

Hematopoietic stem cells can also be recovered from cord blood taken immediately after birth, from fetal liver or marrow, from peripheral blood or from any other organ of the hematopoietic system.

A multiplication potential equal to or greater than  $10^6$  means that a single hematopoietic stem cell can give rise, under suitable conditions, to  $10^6$  blood cells.

The multiplication potential of the hematopoietic stem cells of the invention can reach 1 to 20 times  $10^6$  cells in Stem GEM<sup>®</sup> medium and in traditional culture. This figure can be higher if new cytokines and bioreactors are used.

Hematopoietic lineages is the term used to describe all of the cells giving rise to one of the different blood cell types.

Quiescent cells likely to be within the framework of the invention is the term used to describe cells which do not multiply in an ordinary physiological situation and are likely to be activated in culture. Examples that can be cited are: cells of the liver, cells of the bony tissue, endothelial cells, cells of the tissue of the nervous system, etc. . . . or hematopoietic stem cells, the majority of which remain quiescent in the normal individual.

According to an advantageous embodiment, the invention relates to cells, in particular hematopoietic stem cells, including, inside themselves or on their surface, means of blocking any inhibitor of their cell

cycle.

The following can be cited as means of blocking inhibitors of the cell cycle inside the cell: antisense oligonucleotides, ribozymes, natural or synthetic chemical inhibitors, blocking antibodies, cytokines such as TNF, interferons or factors such as MIP-1, platelet factor 4 or FGF. These can penetrate naturally with suitable culture media or by electroporation, by microinjection or by any other method using a transport through the membrane such as liposomes.

The following can be cited as blocking means inhibiting the cell cycle on the surface of the cell: antibodies of receptors or of membrane antigens, receptor ligands, natural or synthetic, combinations of cytokines comprising various interleukins and CSFs (colony-stimulating factors) or hematopoietic growth factors.

Antibodies and ligands affix themselves specifically to an antigen or a receptor which corresponds to them.

In the cells of the invention, in particular in the hematopoietic stem cells, the blocking means can consist in those chosen from among: anti-inhibitors of the cell cycle, for example agents blocking tumor-suppressing genes, antagonists of TGF- $\beta$ , such as: antisense oligonucleotides of TGF- $\beta$ , antibodies neutralizing TGF- $\beta$ , soluble receptors of TGF- $\beta$ , or natural or synthetic inhibitors of TGF- $\beta$ .

The abbreviation TCF- $\beta$  corresponds to a "transforming growth factor" and corresponds to a family of proteins.

Examples that can be cited of tumor-suppressing antigens are pRb, p107 (Zhu et al., *Genes and Development*, 7: 111-1125, 1993), p130 (Hannon et al., *Genes Dev.*, 7: 23-2391, 1993), p300, p53, p15 (Hannon C. J. & Beach D. (1994): "p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF- $\beta$ -induced cell cycle arrest", *Nature*, 371: 257), p16 (Iverson A. J. (1994): "p16 and familial melanoma", *Nature Genet.*, 371: 180, Sansivestri P. Doctoral Thesis Paris XI, 1994), p21 (Xiong Y., et al., & Beach D. (1993): "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases", *Nature*, 396: 701), and p27 (Polyak et al. (1994a): Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals", *Cell*, 78: 59-66; Polyak et al. (1994a): p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor  $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest", *Genes Development*, 8: 9-22).

The term antagonists of TGF- $\beta$  is used to describe an agent which neutralizes in vitro or in vivo the biological activity of TGF- $\beta$ , types 1, 2 or 3.

The term neutralizing antibodies is used to describe an antibody or a combination of antibodies, preferably a monoclonal antibody or a combination of monoclonal antibodies, which neutralizes in vitro or in vivo the biological activity of TGF- $\beta$ , of types 1, 2 or 3.

The term natural or synthetic inhibitor of TGF- $\beta$  is used to describe a substance which inhibits in vitro or in vivo the biological activity of TGF- $\beta$ .

5'-CCCGGAGGGCGGCATGGGGGA-3' (SEQ ID NO: 1) can be used advantageously as an antisense nucleotide of TGF- $\beta$ . (J. Hatzfeld et al., "Release of Early Human Hematopoietic Progenitors from Quiescence by Antisense Transforming Growth Factor  $\beta$ .1 or Rb Oligonucleotides", *J. Exp. Med.*, vol. 174, October 1991, pp. 925-929).

Also conceivable as blocking means are a cytokine or a combination of cytokines likely to release the stem cells from the quiescent state for a period of less than approximately 10 h.

The following can be cited as cytokines: all interleukins, all CSFs (colony stimulating factors), all immunomodulators including the following interleukins: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, TNFs (tumor necrosis factors), interferons, LIFs (leukemia inhibiting factors), MIP-1 (inflammatory protein produced or acting on the macrophage, Dunlop D. J. et al.: *Blood*, 1992, 79: 2221-2225), the Steel factor, and the ligand of the receptor flt-3 or FL.

A combination of cytokines that can be cited is IL3, IL6, GMCSF (growth factor of granulomonocytic progenitors), SF and FL.

The means of blocking any inhibitor of the cell cycle must be used in a quantity suitable for neutralizing the activity of any inhibitor of the cell cycle. They are generally used in concentrations ranging from 0.1 to 1000 units/ml, preferably from 1 to 10 units/ml.

When an antisense oligonucleotide of TGF- $\beta$  is used, this can be used at from 0.03  $\mu$ M to 100  $\mu$ M, in particular from 5  $\mu$ M to 8  $\mu$ M, or from 0.01  $\mu$ M to 0.5  $\mu$ M in the presence of certain agents for example lipid agents permitting a better penetration of the oligonucleotides into the cell than the previously described penetrations.

According to an advantageous embodiment, the invention relates to quiescent cells, in particular hematopoietic stem cells containing, integrated into their genome, all or part of a heterologous gene.

In fact, after the transfer of all or part of a heterologous gene into their genetic patrimony, the cells can be returned to the quiescent state.

The method of the invention according to which, after the transfer of all or part of a heterologous gene, the cells are returned to the quiescent state, is detailed later in the present description.

The invention also relates to a composition of hematopoietic cells or a cluster of hematopoietic cells or a tissue of hematopoietic cells which are likely to maintain a continuous hematopoiesis for a period greater than or equal to approximately 6 months, and consist in hematopoietic stem cells and where appropriate of progenitors in the course of differentiation, the aforementioned stem cells and the aforementioned progenitors containing all or part of a heterologous gene.

The expression "maintaining a continuous hematopoiesis" corresponds to a physiological production of mature blood cells.

The invention also relates to a method of transferring all or part of a heterologous gene into the genome of cells activated from a quiescent state, in particular of hematopoietic stem cells activated from a quiescent state, characterized in that it comprises the following steps:  
the prestimulation of quiescent cells, in particular of quiescent hematopoietic stem cells, in a prestimulation medium containing:  
direct or indirect means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle of the said quiescent cells, in particular of the said hematopoietic stem cells, for a period which is sufficient to release the cells, in particular the hematopoietic stem cells, from their quiescent state, and preferably does not exceed approximately 72 h, preferably does not exceed 36 h, and is in particular less than approximately 20 h and is preferably approximately 1 to 15, and preferably approximately 1 to 10 h and;  
substances, in particular cytokines, for permitting the activation of a cell cycle and/or subsequently the passage of at least one cell cycle of the said cells, in particular of the said stem cells,  
the step comprising transfer by contacting the cells, in particular of the prestimulated hematopoietic stem cells obtained in the previous step, with all or part of a heterologous gene in a medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene into the genome of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, in order to obtain cells, in particular hematopoietic stem cells including all or part of a heterologous gene,  
the possible recovery of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, obtained in the previous step.

The quiescent hematopoietic stem cells used within the framework of the gene transfer can be obtained from fetal hematopoietic organs, from cord blood, from bone marrow, from peripheral blood or from any other hematopoietic organ, according to the method described in the examples (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A. A., Li M.-L., and Hatzfeld, A.: "Purification and in vitro assay of early human hematopoietic progenitors", 205-221, in Culture of Hematopoietic Cells, Freshney R. I., Pragnell I. B., Freshney M. G., 1994).

As far as the period of prestimulation is concerned, it does not exceed approximately 72 h, preferably 36 h, and is preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h.

The induction of the prestimulation can take place for an extremely short time, of the order of some seconds, but the triggering of all of the cell mechanisms permitting the stem cell to leave the G<sub>0</sub> phase takes at least an hour.

In the case of the use of anti-TGF- $\beta$ , as a blocking means, prestimulation does not exceed approximately 72 h, since beyond 72 h, and in particular beyond 19 h, there is no supplementary effect beyond the prestimulation obtained with combinations of cytokines or anti-TGF- $\beta$ , and combinations of cytokines.

The expression "activation of a cell cycle" corresponds to the introduction of functions permitting the passage of the cell cycle.

The expression "the passage of at least one cell cycle" corresponds to a division of the genome (S phase), and to a mitosis giving two identical cells.

At the end of the gene transfer, the cells can either multiply and differentiate, or they can be returned to the quiescent state, as is explained later in the description.

When the transfected stem cells are returned to the quiescent state, the compartment of the stem cell has "aged" by one division, which is not much compared with its enormous hematopoietic potential.

In the method of the invention, according to an advantageous embodiment the prestimulation medium comprises: IMDM (Iscove Dubelcco Modified Medium), StemGEM\* (corresponding to a range of media marketed by the C.N.R.S.), cytokines, antagonists of TGF- $\beta$ , such as antisense oligonucleotides of TGF- $\beta$ , antibodies neutralizing TGF- $\beta$ , soluble receptors of TGF- $\beta$ , or natural or synthetic inhibitors of TGF- $\beta$ , combinations of cytokines likely to block in a short time space (less than 72 h, preferably less than 10 h) the inhibitors of the cell cycle of the quiescent stem cells, controlled or not by



TGF- $\beta$ .

According to an embodiment of the method of the invention, the cytokines are chosen from among a combination of at least four cytokines chosen from among the following cytokines: IL1 (interleukin 1), IL2 (interleukin 2), IL3 (interleukin 3), IL4 (interleukin 4), IL5 (interleukin 5), IL6 (interleukin 6), IL7 (interleukin 7), IL11 (interleukin 11), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; growth factor of granulocyte-monocytic progenitors), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor; growth factor of granulocytic progenitors), Steel factor (SF), ligand of the receptor FLT3 (FL), erythropoietin, TNF, LIF (leukemia inhibiting factor), thrombopoietin, insulins and FGF.

The transfer of all or part of a heterologous gene can take place with a coculture of cells, in particular of hematopoietic stem cells, which have been prestimulated according to the first step of the method of the invention, and cells producing a vector, such as a viral vector or a retrovirus, containing all or part of the gene to be transferred (Ferry N., Duplessis O., Housain D., Danos O., and Heard J.-M. "Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo". Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 8377-8381, 1991).

The transfer can also be carried out by contacting the cells, in particular of the prestimulated hematopoietic stem cells, with the supernatant of cells containing a vector, such as a viral vector or a retrovirus including all or part of the gene to be transferred (Lu, R. L., Xiao, M., Clapp, D.-W., Li, Z.-H., & Broxmeyer, H. E (1993), J. Exp. Med., 178: 2089-2096).

The invention also relates to a method of transferring all or part of a heterologous gene into the genome of cells activated from a quiescent state, in particular of hematopoietic stem cells activated from a quiescent state, characterized in that it comprises the following steps:

the prestimulation of quiescent cells, in particular of quiescent hematopoietic stem cells, in a prestimulation medium containing:  
direct or indirect means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle of the said cells, in particular of the hematopoietic stem cells, for a period which is sufficient to release the cells, in particular the hematopoietic stem cells, from their quiescent state, and preferably does not exceed approximately 72 h, and preferably does not exceed approximately 36 h, and is in particular less than approximately 20 h, and is preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h, and substances, in particular cytokines, for permitting the activation of a cell cycle and/or subsequently the passage of at least one cell cycle of the said cells, in particular of the said hematopoietic stem cells, the step comprising transfer by contacting the cells, in particular of the prestimulated hematopoietic stem cells obtained in the previous step, with all or part of a heterologous gene, in a medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene into the genome of the stem cells, by coculture of cells, in particular of prestimulated hematopoietic stem cells as indicated above and of cells producing a viral vector or a retrovirus containing all or part of the gene to be transferred, in order to obtain cells, in particular hematopoietic stem cells including all or part of a heterologous gene, and the possible recovery of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells obtained in the previous step.

The coculture can be carried out as described in Human Cord Blood Cells as Targets for Gene Transfer: Potential Use in Genetic Therapies of Severe Combined Immunodeficiency Disease. Moritz T., Keller D. C. and Williams D. A., J. Exp. Med., 178: 529-536 (1993).

The invention also relates to a method of transferring all or part of a heterologous gene into the genome of cells activated from a quiescent state, in particular of hematopoietic stem cells activated from a quiescent state, characterized in that it comprises the following steps:

the prestimulation of quiescent cells, in particular of quiescent hematopoietic stem cells, in a prestimulation medium containing:  
direct or indirect means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle of the said cells, in particular of the said hematopoietic stem cells, for a period which is sufficient to release the cells, in particular the hematopoietic stem cells, from their quiescent state, and preferably does not exceed approximately 72 h, and preferably does not exceed approximately 36 h, and is in particular less than approximately 20 h, and is preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h, and substances, in particular cytokines, for permitting the activation of a cell cycle and/or subsequently the passage of at least one cell cycle of the said stem cells, the step comprising transfer by contacting the cells, in particular of the prestimulated hematopoietic stem cells obtained in the previous step, with all or part of a heterologous gene, in a medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene into the genome of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, by contacting the cells, in particular the stem cells prestimulated as indicated above with supernatant of cells containing a vector, such as a viral vector or retrovirus containing all or part of the gene to be transferred, in order to obtain cells, in particular stem cells including all or part of a heterologous gene, and the possible recovery of the cells, in particular of the stem cells obtained in the previous step.

The invention also relates to a method of transferring all or part of a heterologous gene into the genome of cells activated from a quiescent state, in particular of hematopoietic stem cells activated from a quiescent state, characterized in that it comprises the following steps:  
the preattribution of quiescent cells, in particular of quiescent hematopoietic stem cells, in a preattribution medium containing:

means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle of the said cells, in particular of the said hematopoietic stem cells, for a period which is sufficient to release the cells, in particular the hematopoietic stem cells, from their quiescent state, and preferably does not exceed approximately 72 h, and is in particular less than approximately 20 h, and is preferably approximately 1 to 15 h, and preferably approximately 1 to 10 h, and:

substances, in particular cytokines, for permitting the activation of a cell cycle and/or subsequently the passage of at least one cell cycle of the said stem cells, in particular of the said hematopoietic stem cells,

the step comprising transfer by contacting the cells, in particular of the prestimulated hematopoietic stem cells obtained in the previous step, with all or part of a heterologous gene, in a medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene into the genome of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells, in order to obtain cells, in particular hematopoietic stem cells, including all or part of a heterologous gene, all or part of the heterologous gene originating in particular in a vector, such as a viral vector or a retrovirus, produced by a producing culture to which has been added a viral agent, such as an anti-TGF- $\beta$ , an anti-interferon or any agent permitting an increase in the production and/or the stability of the vector, and the possible recovery of the cells, in particular of the hematopoietic stem cells obtained in the previous step.

As far as the stem cells are concerned, they are possibly returned to the quiescent state after the transfer step.

According to an advantageous embodiment of the method of the invention, the medium permitting the transfer of all or part of the heterologous gene may be comprised of, or contains: DMEM (Eagle medium modified by Dubelcco), IMDM (Iscove medium modified by Dubelcco), cytokines an antagonist of TGF- $\beta$ , as defined above, and anti-interferons, or any other viral agent permitting an increase in the production and/or the stability of the viral vector or of the retrovirus, containing the gene to be transfected, when the transfer of all or part of the heterologous gene is carried out by coculture of the stem cells and of the viral vector, or of the retrovirus.

When the transfer is carried out using a supernatant of the culture containing the vector, the titer of the vector produced by the producer culture can advantageously be increased by adding to the culture producing the vector an anti-TGF- $\beta$ , or an anti-interferon or any other agent likely to increase the production and/or the stability of the vector.

The invention also relates to a method permitting an increase in the titer of a vector, such as a viral vector, or a retrovirus, which vector is produced by a producer culture, by the addition to the said culture of a viral agent such as an anti-TGF- $\beta$ , an anti-interferon, or any vector-stabilizing agent.

At the end of the stage transferring all or part of the heterologous gene into the stem cells, the stem cells which include in their genome all or part of a heterologous gene can be placed in a suitable medium, in particular a liquid medium or a semi-solid medium, in order to multiply and to differentiate into differentiated hematopoietic cells, in particular into differentiated blood cells.

Examples of differentiated cells that can be cited are granulocytes, monocytes, megacaryocytes, and erythrocytes.

At the end of the stage transferring all or part of the heterologous gene into the hematopoietic cells, a step can also be advantageously envisaged which comprises the returning to the quiescent state of the hematopoietic stem cells containing all or part of the heterologous gene, which step can be carried out with the help of at least one inhibitor of the cell cycle, such as TGF- $\beta$ .

More precisely, in order to return the stem cells to the quiescent state (i.e. in Go phase) after the transfer of all or part of a heterologous gene, it is possible to proceed as follows.

The attraction of the method of the invention over all other methods lies in the fact the activation of the quiescent cell takes place in an extremely short period of time (of the order of 1 to 72 preferably 6 to 12 hours starting from the end of the prestimulation step) thanks to a synchronization of the departure from the Go phase for all the quiescent cells at the time of the prestimulation step of the method of the invention as described above. This allows the transfected cells to be returned to the Go phase, after the transfer by addition of TGF- $\beta$ . This guarantees that during the gene transfer the stem cells have not lost their hematopoietic potential, inasmuch as the division number is not more than 1 or 2.

The heterologous gene of which all or part is introduced into the genome of hematopoietic stem cells can be chosen from among the following genes: markers: Neo (neomycin resistance gene), CD2 (leucocytic antigen), nls-lacZ, or genes correcting a hemopathy or any other pathology such as ADA (adenosine deaminase gene), ALDP (gene correcting adrenoleucodystrophy), TK (suicide gene allowing cells to be killed in the presence of acyclovir under the control of viral promoters), this list not being exhaustive.

Current methods of gene transfer do not allow the compartment of the stem cell to be transfected in such a way that the lymphoid lineages are satisfactorily transfected. This is important if one wishes cell therapy to be applicable to the treatment of AIDS or of pathologies affecting the B cells (cells, e.g.,

lymphomas). The transfer method of the invention effectively permits transfer into the B and T lineages, a fact which can be verified using the following two models which permit the development of the compartment of the stem cell to be studied:  
 humanized SCID mice (McCune J. M., Nankawa R., Welbaeher K. N., Kaneshima H., Schultz L. D., Lieberman M. and Weissman I. L.: "The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function", *Science*, 241: 1632-1988), and:  
 cultures of thymic epithelium (Plum J., De Smedt M., Defresne M.-P., Leclercq, G., and Vandekerckhove B.: "Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate to T cells in a mouse thymic microenvironment". *Blood* 84: 1587-1593, 1994).

These methods permit all the lineages including B and T to be obtained in the first case, and the T lineage in the second case.

The media used to permit the division of the compartment of the stem cell once activated to leave the Go phase must respect the expression of the receptors of the stem cell according to the recommendations published in Hatzfeld A. et al., *Hematol.*, 1993, 35: 281-283, and in Panterne et al., *J. Cell. Physiol.*, 91, 1481-1489.

The method of the invention makes it possible in particular:  
 to increase the titer of a vector containing all or part of a heterologous gene to be transfected, in particular into hematopoietic stem cells,  
 to transfer all or part of a gene into quiescent cells, in particular hematopoietic stem cells, in which such a transfer was aleatoric up until the present;  
 to improve the effectiveness of transfer into early hematopoietic progenitors such as CFU-GEMM, LTC-IC (long-term culture-initiating cell), HPP-Q (high proliferative potential quiescent cells) and lymphoid progenitors having a strong proliferative potential considered as "the compartment of the stem cell" compared with the transfer already carried out using the methods of the state of the art; for example, the method will permit a transfer into more than 95% of CFU-GEMMs that can develop into colonies containing more than 10@5 cells, the Stem GEM\* media distributed by the CNRS permitting the evaluation of such cells of the compartment of the stem cell, humanized SCID mice (severe combined immunodeficiency mice) and systems of stromal or thymic epithelium cultures (referred to above) permitting the evaluation of the transfer into the whole of the compartment of the stem cell; and to improve the stability of the expression during the development of the stem cells and the progenitors (amplification and differentiation), it being possible to use marker genes to track and evaluate this expression (example: *nis-lacZ*).

The invention also relates to a method permitting the evaluation of the maturity or immaturity of stem cells, before and/or after the transfer of genes.

More particularly, the invention relates to a method of determining the degree of maturity of stem cells, in particular hematopoietic cells, characterized in that it comprises the following steps:  
 a first set of stem cells, in particular hematopoietic cells, is cultured in a medium which is suitable for their culture but does not contain means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle, for approximately 14 to approximately 28 days, preferably 18 days,  
 a second set of stem cells, in particular hematopoietic cells, is cultured, being of the same kind and having the same degree of maturity as those mentioned above, in a suitable medium containing means for blocking at least one inhibitor of the cell cycle, these blocking means being present in the culture medium in an effective concentration (on condition that they are not diluted more than 4 times compared with the optimum concentration), for a period which does not exceed 72 h, and preferably does not exceed approximately 36 h, and is preferably approximately 1 to 15 h and more preferably from 1 to 10 h, this culture taking place for the same period as that of the first set of stem cells, and a comparison is carried out, 18 days after the culturing of each of the two sets of stem cells, of the number and type of colonies, of the difference in the totals of the colonies having a high proliferative potential (HPP-CFC=cell forming a colony having a high proliferative potential, HPP-  
 MEG=megacaryocyte having a high proliferative potential, HPP-GEMM=granulocyte/erythrocyte/monocyte/megacaryocyte having a high proliferative potential) respectively between that of the second set and that of the first set corresponding to the HPP-Q colonies.

The optimum concentration of antisense oligonucleotides can be approximately 0.001 .mu.M to approximately 100 .mu.M, preferably less than approximately 10 .mu.M.

The optimum concentration of blocking antibodies can be approximately 0.01 .mu.g/ml to approximately 100 .mu.g/ml, preferably 1 .mu.g/ml.

As far as the culture in the presence of means for blocking an inhibitor of the cell cycle is concerned, at the end of the period which does not exceed 72 h, and preferably does not exceed approximately 36 h, and which is preferably approximately 1 to 15 h and more preferably from 1 to 10 h:  
 either the cells can be washed in order to substantially eliminate the aforementioned blocking means, or the aforementioned blocking means can be diluted to a concentration such that they have no proliferative effect on more mature cells (i.e. progenitors which are already activated).

"Evaluation of the maturity or of the immaturity of stem cells" corresponds to the following observation.

After 18 days, the number and type of the colonies is observed under the microscope and a count is carried out of the number of mixed colonies consisting of cells of the red line and of one or more types of cells of the white line. The number of mixed colonies is higher when the cultured cell population is more immature, i.e. is comprised of younger cells some of which are quiescent. On the other hand, the more the cell which has given rise to the colony is immature, even quiescent, the greater is its proliferation potential, and thus the greater will be the size of the colony originating from this cell once activated.

This test will also be called the HPP-Q test in the following.

In order to accomplish the above, a culture of stem cells in a semi-solid or liquid medium which does not contain an anti-inhibitor of the cell cycle is compared with the same culture of stem cells in a semi-solid or liquid medium which does contain an anti-inhibitor of the cell cycle, for example anti-TGF- $\beta$ .

The culture conditions in the medium which does not contain a cell cycle anti-inhibitor can use IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, G-CSF, GM-CSF, SF, FL, FGF, insulin, erythropoietin, thrombopoietin or other cytokines which cooperate or synergize with the above.

The culture conditions in the medium which does contain an anti-inhibitor of the cell cycle for example anti-TGF- $\beta$ , are as follows. Anti-TGF- $\beta$  is added in prestimulation for 10 hours in a small volume of liquid culture containing the quiescent cells such as CD34+CD38- cells (1 to 10% of the most immature CD34+). The volume of this preculture is approximately 1/6 of the final volume. This preculture is then added to methyl cellulose with cytokines to which no anti-TGF- $\beta$  has been added, in order to arrive at the final volume.

A simplification of this procedure involves placing the anti-TGF- $\beta$  immediately in the final culture in concentrations which allow it to be active only during the first hours of the culture, preferably for the first 10 hours.

Under these conditions new colonies, larger than the previous colonies, are observed, derived from cells called high proliferative potential quiescent cells or HPP-Q cells which develop over 18 days and not just over 8, 10, 12 or 14 days as is observed without prestimulation by means of anti-TGF- $\beta$ . The anti-TGF- $\beta$ , thus does not need to be present for the whole period of the culture. As far as the size of colonies is concerned, this can be determined by counting under the microscope on a Mallasez slide, after sampling and dispersion of the colony in a known volume of liquid medium.

Whether the test is carried out in a liquid, clonal or non-clonal medium, the clones or the populations in the two types of culture are compared.

Where HPP-Q cells are concerned, they constitute an element of the compartment of the stem cell and, as to their phenotyping, it is a case of CD34+ kit low IL6-R low.

As far as the culture media are concerned, any medium can be used that is suitable for CFU-GEMM cells and also permits the development of the lymphoid cells.

The composition of the semi-solid culture media can be such as is described in chapter 12 of "Culture of Hematopoietic Cells, R. J. Frehnsney, I. B. Pragnell, M. G. Freshney, ed. Wiley-Liss" pp. 205-221. The title of the chapter is "Purification and in vivo assay of early human hematopoietic progenitors" J. Hatzfeld, P. Batard, A. A. Cardoso, M. L. Li, A. Hatzfeld.

In accordance with the invention, the maturity or immaturity of the stem cells after the transfer of genes can be evaluated. This evaluation is carried out as indicated above, starting from the largest colonies for which it is verified, simultaneously with the aforementioned evaluation of immaturity, whether there has indeed been a transfer of genes, as indicated below in example 1.

The invention relates in particular to a method of transferring genes into the hematopoietic stem cell in which the immaturity of the stem cells is evaluated before the gene transfer, and advantageously after the transfer of genes.

This method can comprise the following steps:

- 1-Evaluation of the hematopoietic cells to be transplanted to ensure that they contain immature cells hereinafter called HPP-Q, an element of the compartment of the stem cell. It is in fact pointless to proceed with a transfer of genes if the cells used are not the right ones. By means of the method of evaluating the immaturity of the stem cells, a culture in a semi-solid or liquid medium, without an anti-inhibitor of the cell cycle, can be compared with the same culture in the presence of an anti-inhibitor. The difference in the number of colonies must demonstrate the appearance of new colonies, larger than the previous colonies, derived from HPP-Q cells.
- 2-Prestimulation of the hematopoietic cells with a medium containing an activator of the cell cycle (10 hours for an anti-TGF- $\beta$ ), in order to remove the hematopoietic cells from the quiescent phase, i.e., in order to activate them.
- 3-Transfer of genes with a viral supernatant or in coculture with cells producing viruses in a medium containing an anti-interferon and/or an anti-TGF- $\beta$ .

4--After the transfer of genes, the activated hematopoietic cells should be capable of being returned to quiescence (Go phase) in a deactivation medium containing an inhibitor of this cell (TGF- $\beta$  in the case of the hematopoietic stem cell).

5--Alternatively, the activated cells, whether or not they have undergone a transfer of genes, can be amplified in order to be re injected in vivo. This can be realized with a sub-population of the cells to be re injected in order to prevent the aplasia which generally precedes the taking up of a graft.

6--Before or after reinfusion of the cells, it is necessary to carry out a HPP-Q test, followed by an in-situ coloring or by a RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) of the colonies obtained in order to evaluate the transfer of genes.

Liquid culture media such as those described in the article by Cardoso et. al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, pp. 8707-8711, September 1993) can be used as prestimulation medium and before the transfer of genes.

The method of the invention also permits the assessment of the number of quiescent primitive cells (HPPQ) before the transfer of genes, in order to determine the abundance of stem cells, or after the transfer of genes, in order to determine the effectiveness of the transfer of genes into the compartment of the stem cell.

#### DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 represents a CPU-GEMM colony expressing in a stable manner the nls-lacZ gene demonstrated by the X-Gal coloring.

FIG. 2 represents, in a greater magnification, a group of erythroid cells of the CFU-GEMM colony with an expression of the homogeneous nls-lacZ gene in all the cells.

FIG. 3 shows the nuclear localization of the  $\beta$ -galactosidase in the macrophages and the absence of non-specific coloring in the cytoplasm.

#### PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTOR

##### EXAMPLE 1

##### Transfer of the Nls-LacZ Gene into Hematopoietic Stem Cells

##### Material and Methods.

##### Hematopoietic growth fat antiserum

The recombinant human interleukin 3 (IL3), recombinant human interleukin 6 (IL6), recombinant human GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) and recombinant human G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) are supplied by Genetics Institute (Cambridge, Mass.). The recombinant human erythropoietin is supplied by AMGEN (Thousand Oaks, Calif.) and the recombinant human SF (Steel factor) comes from IMMUNEX (Seattle, Wash.). The specific activities of these cytokines are respectively: 2.3.times.10<sup>6</sup> U/mg, 4.times.10<sup>6</sup> U/mg, 9.3.times.10<sup>6</sup> U/mg, 7.times.10<sup>4</sup> U/mg, 4.98.times.10<sup>5</sup> U/mg and 10<sup>6</sup> U/mg. The turkey blocking antiserum, anti-TGF- $\beta$ , is a gift from Dr. A. B. Roberts and M. B. Sporn (Danielpour, D., Dart, L. L., Flanders, K. C., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1989) J. Cell. Physiol. 138, 79-86), of which 1  $\mu$ l can neutralize 4 ng of TGF- $\beta$ . It is used in a concentration of 4.2  $\mu$ l/ml.

##### Purification of CD34+ cells

The term CD34+ cells is used to describe cells carrying the CD34 membrane antigen and including a sub-population which represents the compartment of the stem cell.

##### Recovery of cord blood

Samples of human cord blood are recovered from the umbilical cord/placenta immediately after birth, while the placenta remains in situ (Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoe, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Amy, M., Thomas, L., & Boyse, E. A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3829-3832; Gluckman, E., Devergie, A., Thierry, D., Eperou-Bourdeau, H., Traîneau, R., Gerota, J., Brossard, Y., Van Niftrik, J., & Benbunan, M. (1992) Bone Marrow Transplant, 9, 114-117).

##### Purification of SBA-CD34+ cells

The mononuclear cells are obtained as described previously (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S. C., & Hatzfeld, A. (1991), J. Exp. Med., 174, 925-929). Very shortly after the isolation of mononuclear cells on Ficoll Hypaque, the SBA-cells (cells not affixing themselves to soya agglutinin) are purified, eliminating the cells that have remained attached to the soya agglutinin immobilized in a covalent manner using the AIS procedure (procedure developed by the company Applied Immune Sciences). SBA CELLector Flasks are from Applied Immune Sciences Inc. Santa Clara, Calif. The positive selection of CD34+ is obtained with

culture flasks covered with monoclonal CD34+ ICH3 antibodies (CD34 CELLector Flasks, AIS), washed a sufficient number of times (up to 10 times) with a Dulbecco phosphate buffered saline solution, containing 1 mM of EDTA in order to ensure the elimination of the unattached and weakly attached cells (CD34<sup>+</sup> weak) as observed with the reversed microscope (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A. A., Li M.-L., and Hatzfeld, A.: Purification and in vitro assay of early human hematopoietic progenitors, 205-221, in Culture of Hematopoietic Cells, Freshney R. I., Pragnell I. B., Freshney M. G., 1994).

This procedure routinely gives a purity of 95% (+/-3%) of CD34 cells. The isolated CD34+SBA- cells are then detached by a 2-hour incubation at 37 DEG C. in iscove medium modified by Dulbecco (IMDM) to which fetal calf serum (FCS) has been added at 10% or in StemGEM\* medium from the CNRS (medium without serum). The detachment of the cells must be complete, given that the cells which express a high quantity of CD34 antigens represent the most immature progenitors and are the most difficult to detach.

#### Composition of the media

The prestimulation and transfer media are Stem GEM\* media with or without serum (CNRS National Scientific Research Centre UPR 9044 Villejuif France).

#### Transduction method

The line of NB16 cells, a line of cells (Danos, O., and Mulligan R. C.: "Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges". Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 6460-6464, 1988) which expresses the .beta.-galactosidase of E. coli (Strair, R. K., Towle, M., & Smith, B. R. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 47-4762) is supplied by J. M. Heard and O. Danos. These cells are kept in culture in DMEM medium to which has been added 10% serum of new-born calf enriched in iron (Hyclone). This cell line produces a supernatant having a customary viral titer of 1 to 5.10<sup>6</sup> units/ml. The CD34+ cells are prestimulated for various periods (50,000 CD34+ cells in 0.5 ml). They are then placed in coculture for 40 h on NB16 cells at 40% confluence in StemGEM\* medium (CNRS) to which polybrene has been added at 8 .mu.l/ml at 37 DEG C. with 5% of CO2 in a humidity-saturated atmosphere. The CD34+ cells are then gently detached, concentrated and tested for clonogenic trials.

#### Clonogenic trials in methyl cellulose.

The CD34+ cells are cultivated at the rate of 300-400 cells/ml according to a modification of a mixed colony test devised by Fauser and Messner (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S. C., and Hatzfeld, A. (1991), J. Exp. Med., 174: 925-929; Fauser, A. A., & Messner, H. A. (1979) Blood 53, 1023). All the cultures are at least carried out in duplicate.

#### Coloring of the transduced colonies.

After an incubation of 14 to 21 days at 37 DEG C. in a saturated humidified atmosphere, the colonies are counted and classified as described in an earlier manner (Zhou, Y.-Q., Stanley, E. R., Clark, S. C., Hatzfeld, J., Levesque, J.-P., Federici, C., Watt, S. M., & Hatzfeld, A. (1988) Blood 72, 1870-1874). They are then colored by the same histochemical method as that used to assess the titer of a supernatant, with X-Gal as a substrate (MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (1991) Methods Mol. Biol. 7, 217-235) except for the fact that the coloring solution (1 ml/Petri dish) is twice as concentrated as for the adherent cells. The coloring reaction is carried out all night.

#### Statistical analysis.

The significance of differences between the treatment groups is determined using Student's t test.

#### Results.

The infection effectiveness of *nis-lacZ* depends on a 10-h period of prestimulation with anti-TGF- $\beta$ .

The SBA-CD34+++ cells (most immature CD34 cells) are purified with a high recovery of cells of the compartment of the stem cell part of which is formed by the CFU-GEMMs (colony-forming units-granulocyte/erythrocyte/macrophage/megacaryocyte) having a high proliferation potential (greater than 10<sup>6</sup> cells) as described in Material and Methods. These cells are preincubated for various periods with or without anti-TGF- $\beta$ . serum as detailed in table 1 before the coculture with NB16 cells for infection by retroviral vectors. When these cells are prestimulated for 10 h solely with cytokines and without anti-TGF- $\beta$ . before transduction, the transfer effectiveness increases from 1.1 to 23.8%. This increase doubles in a significant manner in the presence of anti-TGF- $\beta$ . serum, rising from 23.8 to 47.3%. The activation effectiveness of the anti-TGF- $\beta$ . disappears during preincubation times which are too long. Prestimulation periods of 20 or 48 h, or longer (not represented), with or without anti-TGF- $\beta$ . serum, deliver results similar to those observed after 10 h without anti-TGF- $\beta$ . serum.

### Effect of anti-TGF- $\beta$ on the transfer effectiveness of nls-lacZ in the different types of progenitors.

Given that a 10-h prestimulation in the presence of anti-TGF- $\beta$  serum gives a significant increase in the total number of transduced colonies, this prestimulation condition was used in the following experiments. Table 2 details the various types of progenitors which are transduced with this method and the relative effectiveness of expression for each of them. The highest effectiveness of expression is obtained with the most immature progenitors, which are the mixed colonies from CFU-GEMM. These progenitors give colonies containing 1 to 2 times 10<sup>5</sup> cells. FIG. 1 shows such a colony. FIG. 2 represents erythroid cells with an expression of the homogeneous nls-lacZ gene in all the cells. FIG. 3 details in a more precise way the nuclear localization of  $\beta$ -galactosidase in the macrophages and proves the absence of non-specific coloring in the cytoplasm. Prestimulation by means of anti-TGF- $\beta$  increases the transfer effectiveness from 54.5 to 95% in CFU-GEMMs (colony-forming units--granulocyte/erythrocyte/macrophage/megacaryocyte), from 43.8 to 66.2% in BFU-Es (burst-forming units--erythroid), from 3.5 to 13.5% in CFU-GMs (colony-forming units--granulocyte/macrophage), from 0 to 9.3% in CFU-Gs (colony-forming units--granulocyte) and from 8.3 to 22.2% in CFU-Ms (colony-forming units--macrophage). Transfer effectiveness is increased compared with the transfection conditions of CFU-GEMM without TGF- $\beta$ .

Prestimulation by means of anti-TGF- $\beta$  increases the stability of the expression of the gene during the development of CFU-GEMMs.

Given that the CFU-GEMMs represent a sub-population of the compartment of the stem cell which takes part in long-term hematopoietic reconstitution (Lu, L., Xiao, M., Shen, R.-N., Grisby, S., & Broxmeyer, H. E. (1993) Blood 81, 41-48), the stability of the expression of the gene during the development of the CFU-GEMMs in mixed colonies was analyzed. In table 3, the CFU-GEMMs are classed according to the percentage of cells expressing nls-lacZ, inside each of the colonies. Prestimulation by means of anti-TGF- $\beta$  serum increases the number of colonies containing from 90 to 100% of cells expressing the nls-lacZ gene. This type of CFU-GEMM does not develop in cultures of cells which are not prestimulated by an anti-TGF- $\beta$  serum. On the contrary, this sub-population represents 41.2% of all the CFU-GEMMs transduced after prestimulation by means of anti-TGF- $\beta$  serum.

It was determined whether the size of the colonies is changed by the transfer of genes. It is observed that the number of cells is not significantly different in the colonies transduced by means of nls-lacZ compared with those that are not.

TABLE 1

The anti-TGF- $\beta$  serum added during a 10-h prestimulation increases the effectiveness of gene transfer.

Anti-TGF- $\beta$ .

Total number

Transfected

Hours antisera of colonies

colonies

% transfer

0 - 103(+,-16)

1(+,-0)

1.1(+,-.05)

+ 94(+,-18)

2(+,-2)

1.54(+,-.4)

df = 2; df = 2; df = 2;

p = 0.330 p = 0.028

p = 0.128

10 - 74(+,-19)

15(+,-5)

23.8(+,-9.0)

+ 125(+,-15)

51(+,-10)

24.8(+,-2.09)

df = 3; df = 3; df = 3;

p = 0.001 p = 0.0004

p = 0.034

20 - 110(+,-7) 24(+,-5)

23.5(+,-1.66)

+ 140(+,-4) 35(+,-4)

24.8(+,-2.2)

df = 2; df = 2; df = 2;

p = 0.015 p = 0.085

p = 0.394

48 - 91(+,-15)

20(+.6)  
 21.9(+.3.7)  
 + 113(+.10)  
 21(+.4)  
 18.7(+.2.2)  
 df = 2; df = 2; df = 2;  
 p = 0.138 p = 0.440  
 p = 0.394

The number of colonies is obtained with 10<sup>3</sup> cells/ml cultivated in methyl cellulose as described in Material and Methods.

TABLE 2

Effect of the anti-TGF- $\beta$  serum on the effectiveness of transfer into different types of hematopoietic progenitors.

% transfer  
 without % transfer with  
 prestimulation by  
 prestimulation  
 Progenitors anti-TGF- $\beta$ .  
 with anti-TGF- $\beta$ .

---

#### CFU-GEMM

Total number of  
 11 21  
 colonies 6 20  
 Transfected colonies  
 54.5 95  
 % transfer  
 BFU-E Total number of  
 67 83  
 colonies 19 55  
 Transfected colonies  
 43.8 66.2  
 % transfer  
 CFU-GM Total number of  
 28 38  
 colonies 1 5  
 Transfected colonies  
 3.5 13.5  
 % transfer  
 CFU-G Total number of  
 21 43  
 colonies 0 4  
 Transfected colonies  
 0 9.3  
 % transfer  
 CFU-M Total number of  
 12 18  
 colonies 1 4  
 Transfected colonies  
 8.3 22.2  
 % transfer

---

CFU-GEMM: colonyforming unit  
 granulocyte/erythrocyte/macrophage/megacaryocyte;  
 BFUE: burstforming unit erythroid;  
 CFUGM: colonyforming unit granulocyte/macrophage;  
 CFUG: colonyforming unit granulocyte;  
 CFUM: colonyforming unit macrophage.

This is the result of one experiment among 3 similar experiments.

TABLE 3

---

Distribution of the transfected CFU-GEMMS  
 according to the stability of the expression of the nls-  
 lacZ gene during the development of the colony.  
 % of cells  
 expressing the  
 nls-lacZ gene



Without anti-TGF- $\beta$ . serum  
 With anti-TGF- $\beta$ . serum  
 in each mixed  
 % of mixed  
 number of cells per  
 % of mixed  
 number of cells per  
 colony colonies  
 mixed colony  
 colonies  
 mixed colony

---

90-100 0 118 706 (+, - 16 300)  
 41.2 152 776 (+, - 18 336)  
 40-90 66.6 121 766 (+, - 10 821)  
 35.3 156 456 (+, - 19 069)  
 0-40 33.3 122 313 (+, - 13 590)  
 23.5 169 963 (+, - 16 919)

---

The results represent the average (+, -SD) of 3 independent experiments.

Table 4. Effect of the anti-TGF- $\beta$ . serum and/or of the anti-interferon (IFN) on the titer of the supernatant produced by the NB16 cell.

---

Supernatant  
 Control anti-IFN antiserum  
 anti-TGF- $\beta$ . antiserum

---

CFU/10<sup>6</sup>@-5  
 6(+, -4.4)  
 65.8 (+, -68.7)  
 38.2 (+, -42.02)  
 number of  
 (n = 6) (n = 6) (n = 4)  
 experiments

---

NB16 cells were cultivated in the absence or in the presence of anti-TGF- $\beta$ . or of anti-interferon.

The supernatants are then added to the cultures of non-confluent 3T3 cells. When the cells are confluent, they are colored by X-Gal and the viral foci are counted and the titer is expressed by the number of viral foci multiplied by the inverse of the dilution of the initial supernatant.

The addition of anti-TGF- $\beta$ . or of anti-interferon during the coculture can increase the transfer percentage (result not shown) in the hematopoietic cells through a direct effect on the producer line. Table 4 shows in fact that, when anti-TGF- $\beta$ . or a viral agent such as an anti-interferon is added to the NB16 cells, the titer of the supernatant is increased. The supernatant obtained after treatment with anti-interferon actually increases by 11 times the number of infection foci and with anti-TGF- $\beta$ . it increases by 6 times.

## EXAMPLE 2

The results obtained in tests comparing prestimulation with or without an anti-inhibitor of the cell cycle are given below.

The purpose of the example is to remove from the quiescent phase primitive progenitors which would be under the control of an autocrine TGF- $\beta$ . This removal is achieved after a short stimulation period (10 hours) then the phenomenon is demonstrated by placing activated progenitors in a semi-solid culture and reading the number of mixed colonies after 21 days of culture (Faumer A. A. and Messner H. A. (1979). Identification of Megakaryocytes, Macrophages, and Eosinophils in Colonies of Human Bone Marrow Containing Neutrophilic Granulocytes and Erythroblasts. Blood, 53: 1023-1027).

Experimental protocol:

Purification of the CD34+ cells of cord blood.

The cells are incubated in 2 different basic media:

A: GTL medium, and

B: standard liquid medium with 10% fetal calf serum.

The composition of the GTL medium is described in "Specific role of lipids, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems", J. Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigne, M. Sasportes, R. Willis and D. B. McClure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation Vol. 9, Growth of Cells in Horizontally Defined Media, 1982, pp. 703-710.

The composition of the GTL medium is as follows:

IMDM: basic medium,

+ 1 mg/ml reconstituted delipidated bovin serum albumin with 5 .mu.g/ml oleic acid, 5 .mu.g/ml linoleic acid, 1 .mu.g/ml palmitic acid,

+ transferrin 5 .mu.g/ml ("Specific role of lipide, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems", J. Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigne, M. Sasportes, R. Willis and D. B. McClure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation Vol. 9, Growth of Cells in Horizontally Defined Media, 1982, pp. 703-710).

The composition of the standard medium is as follows: IMDM+10% fetal calf serum,

1 mg/ml bovin serum albumin,

2 mM glutamine,

10 .mu.g/ml transferrin, and

4.times.10<sup>-5</sup> M .beta.-mercaptoethanol.

At least 6 of the following cytokines are added to these two basic media: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, GCSF, SF, EPO, GM-CSF, FL, TPO, FGF, insulin or synthokins activating the receptors corresponding to these cytokines.

In each group of media A and B, the following conditions are tested:

1) control: nothing else is added, and

2) addition of an anti-TGF- $\beta$ . antibody from Stern GEM<sup>+</sup> CNRS, 7 rue Guy Moquet, 94801 Villejuif, FRANCE.

The cells are placed in the oven for 10 hours at 37 DEG C., 5% CO<sub>2</sub>; 1000 cells in 0.4 ml of medium.

At the end of the prestimulation period, 2.1 ml of semi-solid medium are added to the cells. This is incubated for 21 days at 37 DEG C., 5% CO<sub>2</sub>.

Results:

Each figure represents the average of two dishes. Only the counts for mixed colonies (colonies consisting of red cells+one or more types of lineages of white cells) which come from the most immature cells are counted.

#### Exp A Exp B Exp C

---

Control (1) 8 6 1

In the presence of

15 12 4

anti-TGF- $\beta$ . antibody (2)

---

#### EXAMPLE 3

It was also verified that more elaborate combinations of factors than those already used do not have as efficient an effect as anti-TGF- $\beta$ .

Numerous combinations, more elaborate than the previous combinations, of cytokines were compared in cultures with and without anti-TGF- $\beta$ . It was observed that certain combinations of cytokines can have an effect similar to the effect of anti-TGF- $\beta$ . on the colonies which develop rapidly and thus come from already activated slow progenitors. On the other hand, the effect of anti-TGF- $\beta$ . cannot be replaced by any combination of cytokines for the development of colonies over 18 days.

Moreover, although it was known that cytokines induce the amphotropic receptor of the retroviruses used for a transfer of genes, it was shown, thanks to the invention, that anti-TGF- $\beta$ . increases the expression of the receptors of cytokines, and thus their action, and thus the expression of the amphotropic receptors, and thus the transfer of genes. The increase in the expression of the receptors of cytokines for anti-TGF- $\beta$ . is principally clear on quiescent cells.

#### EXAMPLE 4

A unicellular cultures condition example for (CD34+CD38 weak cells) compares the effect of FL/bFGF (Flk ligand/basic fibroblast growth factor) and anti-TGF- $\beta$ -1 antibody (from StemGEM\*) in the following medium: medium B: serum/IL3/IL6/SF/GCSF) on D0, and medium B+GMCSF+EPO on D12.

Four culture medium conditions were used:

1. standard medium with 24% fetal calf serum and 4 cytokines (IL3, IL6, SF, GCSF),
2. standard medium with 10% fetal calf serum and 4 cytokines (IL3, IL6, SF, GCSF)+FL/bFGF,
3. standard medium+anti-TGF- $\beta$ . antibody (from Stem GEM\*), and
4. standard medium+FL/bFGF+anti-TGF- $\beta$ . antibody (from Stem GEM\*), and

#### Results:

The four conditions give the following results:  
For the cycling of the cells:

- \* 1. 50% of the cells give clones of more than 100 cells,
- 2. 75% of the cells give clones of more than 100 cells,
- 3. 75% of the cells give clones of more than 100 cells, and
- 4. 75% of the cells give clones of more than 100 cells.

There is thus no additive effect in combination 4.

It would appear that it is the same population that is involved.  
For proliferation, conditions 2 and 3 give the following results:

Condition 2, 15-20% of the clones contain more than 10@4 cells,

Condition 3, 50% of the clones contain more than 10@4 cells.

Thus the anti-TGF- $\beta$ . antibody is more effective than the FL/bFGF.

Regarding the type of cells obtained:

with combination 2, it is principally Gs and Ms (more mature cells) that are obtained, i.e., granulocytes and monocytes.  
with combinations 3 and 4, it is principally red and mixed cells (i.e. a mixture of red cells and white cells) that are obtained.

The antibody thus induces the cycling of earlier cells, since it is only with the anti-TGF- $\beta$ . antibody that the erythroid or mixed paths are stimulated.

Overall these results reveal the advantages of the brief treatment by means of anti-TGF- $\beta$ . according to the invention.

All publications dealing with the transfer of genes stress the two important parameters of an effective transfer: a supernatant with a high viral titer and the cycling of the cell to be infected. This is the reason why the stem cells are stimulated with cytokines. In the publications, stimulation takes place for more than 72 hours and concerns cells which are already in cycle. At the end of 72 hours, many of these cells have already started to differentiate. The cells which are infected are thus much less immature than at the start. With anti-TGF- $\beta$ ., and in accordance with the method of the invention, the cells are stimulated for a very short time and are cells which are initially quiescent. They have only had time to enter into cycle, with no or little differentiation. The method of the invention allows them to be returned to the quiescent phase immediately after the transfer of genes thanks to a brief treatment by means of TGF- $\beta$ .. As a result, the cells which are transfected are more immature, which is the end that is sought in gene therapy using hematopoietic stem cells. This method can be applied to other types of cells, possibly using other anti-inhibitors of the cell cycle (anti-Rb: retinoblastoma susceptibility antigen, anti-INK: kinase anti-inhibitor, etc.).

These anti-inhibitors can be antisense oligonucleotides, blocking antibodies, natural or synthetic inhibitors.

---

# SEQUENCE LISTING  
- <160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 1  
- <210> SEQ ID NO 1

<211> LENGTH: 21  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Unknown  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Unknown Or - #ganism:NONE  
- <400> SEQUENCE: 1  
#21 gggg a

---

Data supplied from the esp@cenet database - 12

## Claims

What is claimed is:

1. In a method of efficient gene transfer, a method of prestimulation comprising the steps of: providing a culture containing primitive stem cells in a quiescent state; providing a time-limited prestimulation of said primitive stem cells by adding a blocking means to said culture to block at least one inhibitor of a cell cycle of said primitive stem cells, wherein said time-limited prestimulation is for a period less than approximately 36 hours so that said culture of primitive stem cells retains hematopoietic potential.
2. The method of claim 1, further comprising the steps of: after the step of providing a culture of primitive stem cells in a quiescent state, preparing a blocked culture by placing a first portion of said primitive stem cells using a culture medium, and completing the step of providing a time-limited prestimulation with said first portion; preparing a non-blocked culture with a second portion of said primitive stem cells in said culture medium, leaving said culture medium free of said blocking means; and comparing a degree of maturity of said blocked and non-blocked cultures of said primitive stem cells so that the first portion can be evaluated to determine the presence of quiescent primitive cells.
3. The method of claim 1, further comprising the step of, after the time-limited prestimulation step, transferring genes into said primitive stem cells.
4. The method of claim 1, further comprising the steps of: providing primitive stem cells which are hematopoietic cells; and providing said block means using anti-TGF- $\beta$ .
5. The method of claims 1, wherein said blocking means comprises anti-TGF- $\beta$ , from 0.01  $\mu$ M to 0.5  $\mu$ M.
6. The method of claim 1, wherein said step of prestimulating stem cells occurs for a period less than approximately 10 hours.
7. Quiescent stem cells containing a heterologous gene in the genome, obtained by the production of hematopoietic stem cells by a method comprising: prestimulating stem cells, said stem cells being primitive quiescent hematopoietic stem cells, for a period so that said stem cells remain substantially primitive, said period being less than approximately 36 hours, in a medium comprising blocking means for blocking at least one inhibitor of a cell cycle of said stem cells, to release said stem cells from their quiescent state, and cytokines for permitting at least one of the activation of said cell cycle and the passage of at least one subsequent cell cycle; contacting said prestimulated stem cells with a heterologous gene in a transfer medium permitting transfer of said heterologous gene into the genome of said prestimulated stem cells so that said genome contains said heterologous gene; and after said contacting step, returning said stem cells to a controlled quiescent state so that said stem cells have been transfected while retaining their differentiation potential.
8. A primitive hematopoietic stem cell comprising a genome with a heterologous gene, wherein said stem cell has a multiplication potential of 1.times.10<sup>6</sup> and a differentiation potential covering all hematopoietic lineages.
9. The stem cell of claim 8, further comprising a blocking inhibitor of its cell cycle located either on a surface of or interior to said stem cell.
10. The stem cell of claim 8, wherein said stem cell is in a controlled quiescent state.
11. The stem cells of claim 7, wherein said blocking means is selected from the group consisting of an agent blocking tumor-suppressing genes, an antisense oligonucleotide of TGF- $\beta$ , an antibody neutralizing TGF- $\beta$ , a soluble receptor of TGF- $\beta$ , a natural inhibitor of TGF- $\beta$ , a synthetic inhibitor of TGF- $\beta$ , and an inhibitor of the TGF- $\beta$  synthesis path.
12. The stem cell of claim 8, wherein said heterologous gene is selected from the group consisting of: marker genes, hemopathy correcting genes, and pathology correcting genes.
13. The stem cell of claim 12, wherein said heterologous gene is selected from the group consisting of: a neomycin resistance gene, a leucocytic antigen, a nls-lacZ gene, a adenosine deaminase gene, a gene correcting adeno-leucodystrophy, and a suicide gene allowing cells to be killed in the presence of acyclovir under the control of viral promoters.
14. A method of transferring a heterologous gene into a primitive cell genome activated from a quiescent state, comprising the steps of: prestimulating primitive cells, said cells being in a quiescent state, for a period so that said primitive

cells remain substantially primitive, said period being less than approximately 36 hours, in a medium comprising blocking means for at least one inhibitor of a cell cycle of said primitive cells, to release said primitive cells from the quiescent state, and cytokines for permitting at least one of the activation of said cell cycle and the passage of at least one subsequent cell cycle;

contacting said primitive cells with a heterologous gene in a transfer medium permitting transfer of said heterologous gene into the genome of said primitive cells so that said genome contains said heterologous gene; and

recovering said primitive cells obtained in said contacting step.

15. The method of claim 14, wherein in said prestimulation step, said primitive cells are hematopoietic stem cells.

16. The method of claim 15, wherein said contacting step occurs with a coculture of said primitive stem cells and cells producing one of a viral vector and a retrovirus containing the heterologous gene to be transferred.

17. The method of claim 15, wherein said contacting step occurs by bringing together said primitive stem cells and a supernatant of cells containing one of a viral vector and a retrovirus containing the heterologous gene to be transferred.

18. The method of claim 15, wherein said contacting step occurs using one of a viral vector and a retrovirus produced by a producer culture, said producer culture having comprised one of an anti-TGF- $\beta$ , an anti-interferon, and a vector-stabilizing agent.

19. The method of claim 15, wherein said blocking means is selected from the group consisting of an antisense oligonucleotide of TGF- $\beta$ , an antibody neutralizing TGF- $\beta$ , a soluble receptor of TGF- $\beta$ , a natural inhibitor of TGF- $\beta$ , and a synthetic inhibitor of TGF- $\beta$ .

20. The method of claim 19, wherein said prestimulation step occurs for a period less than approximately 10 hours.

21. The method of claim 15, wherein said medium further comprises a four cytokine combination selected from the group consisting of IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, GM-CSF, G-CSF, steel factor, ligand of FLT3, erythropoietin, TNF, LIF, thrombopoietin, insulin, and synthetic synthokin.

22. The method of claim 15, wherein said gene to be transferred is contained within a viral vector or a retrovirus and said transfer medium is comprised of IMDM, cytokines, and one of the group consisting of an antagonist of TGF- $\beta$ , and an anti-interferon so that production of said viral vector or retrovirus is increased.

23. The method of claim 14, wherein upon conclusion of said contacting step, said cells comprise a culture of hematopoietic stem cells suitable for obtaining differentiated blood cells.

24. The method of claim 15, wherein said prestimulation step occurs for a period less than approximately 10 hours and further comprising the step of, prior to said recovery step, returning said cells to a controlled quiescent state using an inhibitor of the cell cycle.

25. A method of increasing the titer of a vector, comprising the steps of:  
providing a producer culture, said producer culture including one of an anti-TGF- $\beta$  and an anti-interferon; and  
producing a viral vector or a retrovirus by said producer culture.

Data supplied from the esp@cenet database - I2